

# Nutzung der orts- und zeitaufgelösten Detektion der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz zur Evaluierung der Photodynamischen Inaktivierung von Mikroorganismen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

Im Fach Physik  
Spezialisierung: Experimentalphysik

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

Von  
M. Sc. Tobias Bornhütter

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:    1. Prof. Dr. Beate Röder  
                             2. Prof. Dr. Wolfgang Bäuml  
                             3. Prof. Dr. Oliver Benson

Tag der mündlichen Prüfung:

22.02.2018

## Abstract

The Photodynamic Inactivation of Microorganisms (PDI) is a promising method to combat different microorganisms such as bacteria, fungi or algae. The mechanism of PDI is based on the selective generation of reactive oxygen species, particularly of molecular oxygen in its first excited singular state (singlet oxygen), in a lethal dose. Singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is generated via the interaction of a photosensitizer with light and molecular oxygen.

The only method for directly detecting  $^1\text{O}_2$  is the measurement of its characteristic phosphorescence at 1269 nm ( $^1\text{O}_2$  luminescence). The kinetics of the  $^1\text{O}_2$  luminescence can be utilized to draw conclusions about the microenvironment of the photosensitizer, since both, generation and deactivation of  $^1\text{O}_2$ , are diffusion controlled. Due to the extremely low phosphorescence quantum yield of  $^1\text{O}_2$  and low detection efficiency because of its spectral position, the detection of  $^1\text{O}_2$  luminescence requires a considerable amount of specialised knowledge and technical efforts. Hitherto, the time-resolved detection of  $^1\text{O}_2$  luminescence at microorganisms has only been successful in suspensions.

This thesis presents fundamentals for the use of laterally and time-resolved detection of  $^1\text{O}_2$  luminescence as a tool for evaluating PDI of microorganisms on surfaces. To provide these fundamentals, a setup for lateral and time-resolved  $^1\text{O}_2$  luminescence detection was planned, constructed and characterised. This setup allows 2D scanning of photosensitizer fluorescence and time-resolved  $^1\text{O}_2$  luminescence on surfaces. The investigation of the  $^1\text{O}_2$  luminescence quenching behaviour of different culture media on agar was a prerequisite for studies of the  $^1\text{O}_2$  luminescence on surfaces of cultivated microorganisms.

In studies regarding four different microorganisms and two photosensitizer, the direct time-resolved detection of  $^1\text{O}_2$  luminescence on the surface of cultured microorganisms was succeeded for the first time. Here, the bacterium *Escherichia coli*, the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, the mould *Scopulariopsis brevicaulis* and the algae *Chlorella fusca* var. *vacuolata* were under investigation.

The comparison of fluorescence and  $^1\text{O}_2$  luminescence scans allows gathering information about the diffusion properties of the photosensitizer as well as the quenching properties of the microorganisms. The analysis of the  $^1\text{O}_2$  luminescence kinetics exemplifies, that the determination of the  $^1\text{O}_2$  luminescence kinetics is possible over the period of the microorganisms' PDI. Furthermore, even first hints to a systematic change in the  $^1\text{O}_2$  luminescence kinetics in dependence of the concentration of the microorganisms have been documented.

# Zusammenfassung

Die Photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen (PDI) ist eine vielversprechende Methode zur Bekämpfung verschiedener Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Algen. Grundlage der PDI ist die gezielte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in toxischer Dosis, insbesondere von molekularem Sauerstoff im ersten angeregten Singulett-Zustand (Singulett-Sauerstoff). Die Generierung von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) erfolgt durch die Wechselwirkung eines Photosensibilisators mit Licht und molekularem Sauerstoff.

Ein direkter Nachweis von  $^1\text{O}_2$  ist nur durch die Detektion seiner charakteristischen Phosphoreszenz bei 1269 nm ( $^1\text{O}_2$  Lumineszenz) möglich. Die Kinetik der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz erlaubt Rückschlüsse auf die Mikroumgebung des Photosensibilisators, da sowohl die Generierung als auch die Deaktivierung von  $^1\text{O}_2$  durch Diffusion bestimmt wird. Die Phosphoreszenz-Quantenausbeute des  $^1\text{O}_2$  ist sehr gering und die spektrale Lage der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz bedingt geringe Detektionseffizienz und hohes Rauschen. Daher erfordert die zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz hohen Aufwand an Technik und Fachwissen. Bisher gelang die zeitaufgelöste Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an Mikroorganismen nur in Suspensionen.

In dieser Arbeit werden Grundlagen für die Nutzung der orts- und zeitaufgelösten Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf Oberflächen als Werkzeug für die Evaluierung der PDI auf Oberflächen vorgestellt. Um diese Grundlagen zu schaffen, wurde ein Messplatz zur orts- und zeitaufgelösten Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf Oberflächen geplant, konstruiert, charakterisiert und getestet. Der Messplatz ermöglicht Scans der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und der Fluoreszenz des Photosensibilisators auf Oberflächen. Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener Nährmedien auf das  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzsignal an der Oberfläche von Nährböden ermöglichen die Wahl eines passenden Nährmediums für  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Untersuchungen an kultivierten Mikroorganismen.

In Untersuchungen an vier verschiedenen Mikroorganismen mit zwei Photosensibilisatoren gelingt erstmals der direkte, zeitaufgelöste Nachweis von  $^1\text{O}_2$  an Oberflächen kultivierter Mikroorganismen am Beispiel des Bakteriums *Escherichia coli*, des Dermatophyten *Trichophyton rubrum*, des Schimmelpilzes *Scopulariopsis brevicaulis* und der Alge *Chlorella fusca* var. *vacuolata*.

Durch den Vergleich von Fluoreszenz-Scans und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz-Scans können Aussagen über das Diffusionsverhalten der Photosensibilisatoren und das  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Quenching der Mikroorganismen getroffen werden. Eine Analyse der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik zeigt, dass die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und die Bestimmung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik im Zeitraum der PDI aller untersuchten Mikroorganismen möglich ist. Zudem werden erste Hinweise auf eine Abhängigkeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik zum Wachstum der Mikroorganismen gefunden.

# Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	2
Zusammenfassung .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	4
1 Einleitung & Motivation .....	7
1.1 Sauerstoff und der Photodynamische Effekt .....	8
1.2 Photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen .....	10
1.3 Spektroskopische Untersuchung des Photodynamischen Effekts .....	11
1.4 Ziel dieser Arbeit .....	12
2 Grundlagen .....	14
2.1 Sauerstoff .....	14
2.1.1 Molekularer Sauerstoff und Sauerstoffradikale .....	14
2.1.2 Generierung und Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff .....	17
2.2 Nachweis und Charakterisierung von Singulett-Sauerstoff .....	23
2.2.1 Grundlagen der direkten Detektion der Singulett-Sauerstoff Phosphoreszenz ..	24
2.2.2 Kinetik in homogenen Systemen .....	25
2.2.3 Diffusion .....	29
2.2.4 Kinetik in inhomogenen Systemen .....	30
2.2.5 Überlegungen zur Auswertung von Singulett-Sauerstoff Lumineszenzmessungen auf Oberflächen .....	32
2.3 Photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen .....	34
2.3.1 Photosensibilisatoren in der PDI .....	39
3 Zeitaufgelöste Detektion von Singulett-Sauerstoff auf Oberflächen .....	45
3.1 Entwicklung eines Messplatzes zur zeitaufgelösten Detektion der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz auf Oberflächen .....	45
3.1.1 Anforderungen und Konzept .....	45
3.1.2 Technische Umsetzung .....	47
3.1.3 Aufbau des Programms zur Bedienung des Messplatzes .....	54



3.2	Möglichkeiten und Grenzen des Messplatzes.....	58
3.2.1	Vertikale Justierungsempfindlichkeit .....	59
3.2.2	Vergleichbarkeit der Singulett-sauerstoff Lumineszenzkinetik mehrerer, direkt nacheinander durchgeführter Messungen .....	61
3.2.3	Langzeitvergleichbarkeit der Singulett-sauerstoff Lumineszenzkinetik.....	63
3.2.4	Vergleichbarkeit und Schwankung der Singulett-sauerstoff Lumineszenzkinetik bei einem 2D-Scan.....	64
3.2.5	Vergleich zwischen 600 µm und 2000 µm Detektionsfaser .....	66
3.3	Auswertung und Interpretation der Messdaten .....	67
3.3.1	Modellierung und Anpassung komplexer Lumineszenzkinetik .....	67
3.3.2	Auswertung von 2D-Scans .....	73
3.4	Detektion von photosensibilisiert generiertem Singulett-sauerstoff auf Nährböden.....	78
3.5	Einfluss von verschiedenen Nährmedien in Agarplatten auf das Singulett-sauerstoff Lumineszenzsignal.....	79
3.6	Bestimmung der optimalen Probenpräparation und Messbedingungen.....	84
3.7	Empfindlichkeit des Messplatzes bei Singulett-sauerstoff Lumineszenzmessungen auf Nährböden.....	87
3.7.1	Probenpräparation .....	87
3.7.2	Durchführung und Ergebnisse.....	88
4	Untersuchungen zur Singulett-sauerstoff Lumineszenzkinetik an verschiedenen Mikroorganismen auf Nährböden .....	92
4.1	Nachweis der Singulett-sauerstoff Lumineszenz an gram <sup>-</sup> <i>Escherichia coli</i> Bakterien .....	94
4.1.1	Probenpräparation .....	94
4.1.2	Durchführung und Ergebnisse.....	96
4.1.3	Diskussion.....	102
4.2	Nachweis der Singulett-sauerstoff Lumineszenz an Dermatophyten und Schimmelpilzen.....	104
4.2.1	Probenpräparation .....	104
4.2.2	Durchführung und Ergebnisse.....	105

4.2.3 Diskussion.....	111
4.3 Nachweis der Singulett-sauerstoff Lumineszenz an Grünalgen.....	112
4.3.1 Probenpräparation und Durchführung .....	112
4.3.2 Ergebnisse.....	113
4.3.3 Diskussion.....	118
4.4 Zusammenfassung und Diskussion der Untersuchungen zur Singulett-sauerstoff Lumineszenzkinetik an verschiedenen Mikroorganismen auf Nährböden.....	119
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	123
Abkürzungen.....	127
Literatur .....	128
Abbildungsverzeichnis .....	140
Publikationen .....	147
Danksagung.....	149
Erklärung.....	150

# 1 Einleitung & Motivation

Zur Behandlung bakterieller Infektionen haben sich seit den 1930er Jahren Antibiotika durchgesetzt. Allerdings kommt es immer häufiger vor, dass sich die Krankheitserreger nicht mehr mit zuvor bewährten Antibiotika bekämpfen lassen. Die Ursache dafür liegt in der Resistenzbildung von Bakterienstämmen gegen Antibiotika. Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO*) hat im Jahr 2014 mit dem „*Antimicrobial Resistance – Global Report and Surveillance*“ einen Überblick über die weltweite Situation gegeben [1]. Aufgrund der darin dokumentierten besorgniserregenden Entwicklung dieses Phänomens wurde im Jahr 2015 der „*Global action plan on antimicrobial resistance*“ von der WHO vorgestellt [2].

Neben dem präventiven Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung und der Landwirtschaft ist eine der wesentlichen Ursachen für die Bildung und Verbreitung von resistenten Erregern in Krankenhäusern zu finden. Bereits in den 1930er Jahren wurden Sulfonamid-resistente *Streptococcus pyogenes* in Militärkrankenhäusern nachgewiesen [3]. Ursachen der Resistenzbildung sind neben der unsachgemäßen Verwendung von Antibiotika in der Behandlung von Krankheiten die hohe Mutationsrate von Bakterien in Verbindung mit ihrer Fähigkeit, über Artengrenzen hinweg Genmaterial auszutauschen [4,5]. Bis in die frühen 1990er Jahre wurde der Resistenzbildung durch die Entwicklung neuer Antibiotika begegnet. In den letzten 25 Jahren nimmt die Entwicklung neuer Antibiotika allerdings stetig ab, sodass Brown et al. in einem Review zu dem Thema in *Nature* im Januar 2016 von einem „Versagen bei der Entdeckung antibakterieller Arzneimittel“ („*failure in antibacterial drug discovery*“) [5] sprechen. [3–11]

Ein wichtiger Verbreitungsweg für resistente Erreger, insbesondere in Krankenhäusern, ist die Übertragung der Erreger von Menschen auf verschiedene Oberflächen und von dort auf andere Menschen [12]. Pathogene Bakterien können auf Oberflächen bis zu 24 Stunden überleben [10]. Erreger sind allerdings nicht nur Bakterien. Auf Oberflächen in Krankenhäusern tummeln sich verschiedene Mikroorganismen. Diese können sich durch die Bildung einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen zu einem Biofilm ausbauen. Neben verschiedenen Bakterien werden auch Pilze und Algen angetroffen. Pathogene Pilze können Infektionskrankheiten verursachen, die in vielen Fällen nur aufwendig und ineffizient behandelt werden können [13]. Zwar können auch Algen Infektionskrankheiten bei Menschen verursachen, diese sind aber sehr selten [14].

Algen sind allerdings ein wichtiger Bestandteil natürlicher Biofilme. Diese sind die Hauptursache der Biokorrosion von Baustoffen, welche für enorme kulturelle Schäden verantwortlich ist. Derzeit werden natürliche Biofilme durch mechanische oder chemische Methoden bekämpft. Allerdings

verursacht die chemische Bekämpfung mit Bioziden eine Belastung der Umwelt und die mechanische Bekämpfung von Biofilmen führt zu starker Erosion, welche wiederum das Wachstum neuer Biofilme fördert. [12–15]

Die Suche nach Alternativen zu Antibiotika und Bioziden sowie die Entwicklung neuer Methoden zur Bekämpfung von Mikroorganismen ist deshalb von hoher Relevanz für die Gesellschaft. Ein sehr vielversprechender Ansatz ist die Photodynamische Inaktivierung (PDI) von Mikroorganismen. Diese nutzt den Photodynamischen Effekt zur Bekämpfung von verschiedenen Mikroorganismen. Dabei werden Radikale durch das Zusammenspiel von Licht, einem *Photosensibilisator* genannten Wirkstoff und Sauerstoff generiert. In einer Zelle bringen die so generierten Radikale die natürliche Balance aus Radikalfängern und Radikalen aus dem Gleichgewicht, sodass eine toxische Wirkung einsetzt. Im Gegensatz zu Antibiotika, die gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip wirken, beruht die photodynamische Inaktivierung dementsprechend nicht auf einer spezifischen biochemischen Reaktion, sondern auf der oxidativen Beschädigung der Zelle. Deshalb können durch die PDI nicht nur Bakterien, sondern auch andere Mikroorganismen, wie Pilze oder Algen bekämpft werden.

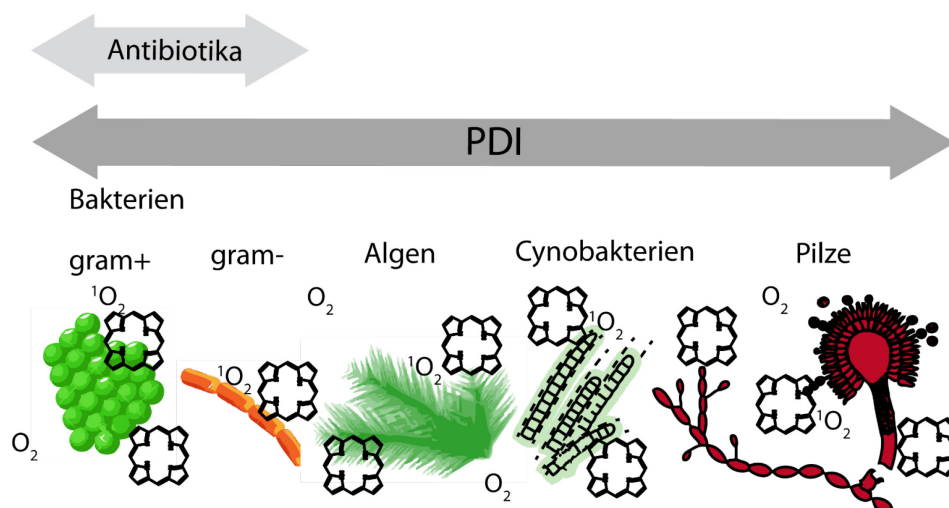


Abbildung 1: Mögliche Anwendungsgebiete der PDI. Im Gegensatz zu Antibiotika, die nur gegen Bakterien wirken, kann die PDI auch gegen phototrophe Organismen wie Algen oder Cyanobakterien und Pilze eingesetzt werden. Übersetzt aus [30].

## 1.1 Sauerstoff und der Photodynamische Effekt

Sauerstoff als Element wurde in der „Chemische[n] Abhandlung von der Luft und dem Feuer“ von Carl Wilhelm Scheele im Jahr 1777 erstmals erwähnt. In den darauffolgenden Jahrzehnten und Jahrhunderten wurde die wichtige Rolle des Sauerstoffs im Ökosystem der Erde immer deutlicher. Heute ist bekannt, dass Sauerstoff eines der häufigsten Elemente auf der Erde ist und eine essenzielle Rolle für den Metabolismus der meisten Lebewesen spielt. Nachdem die Bedeutung von

Sauerstoff für das Leben klar wurde, kam auch die Erkenntnis, dass Sauerstoff toxisch wirken kann. In den Studien von Paul Bert aus dem Jahr 1878 wurde gezeigt, dass der Sauerstoffpartialdruck in der Luft ausschlaggebend für das Überleben von Lebewesen ist, und Sauerstoff in zu hohen Konzentrationen tödlich auf lebende Zellen wirkt. [16,17]

Auch wenn der Zusammenhang zwischen dem Photodynamischen Effekt und Sauerstoff noch nicht bekannt war, wurde im 19. Jahrhundert bereits mehrfach berichtet, dass bestimmte Medikamente nur wirken, wenn der Patient dem Sonnenlicht ausgesetzt ist. Die ersten systematischen Untersuchungen des Einflusses des Lichts wurden von Oskar Raab unter Hermann von Tappeiner an der Universität München ab 1887 durchgeführt. Im Jahr 1904 prägte von Tappeiner erstmals den Begriff „Photodynamische Reaktion“ [18]. Kurz vorher, im Jahr 1902, äußerte Ledoux-Lebard erstmalig die Vermutung, dass Sauerstoff eine Grundvoraussetzung für die Photodynamische Reaktion ist. In den folgenden Jahren wurden verschiedene biologische und medizinische Versuche durchgeführt, darunter auch erste erfolgreiche therapeutische Versuche am Menschen. [18–21]

Seit den 1930er Jahren wurden auch erfolgreiche photodynamische Inaktivierungen von Bakteriophagen publiziert [22–24]. Es folgten vereinzelte Berichte von erfolgreichen Inaktivierungen von Bakterien, Pilzen und Viren [25,26]. Das Hauptaugenmerk der Forschung lag jedoch bis in die 1990er Jahre auf der Photodynamischen Therapie (PDT) von Tumoren. Dabei konzentrierte sich die Forschung auf die Entwicklung neuer Photosensibilisatoren und Targeting-Mechanismen, also Möglichkeiten, den Photosensibilisator zielgerichtet im Tumorgewebe zu akkumulieren.

Als Gründe dafür, dass die PDT deutlich wichtiger erschien als die Bekämpfung von Mikroorganismen sind vor allem zwei zu nennen: 1. Die damals in der PDT erfolgreichen Photosensibilisatoren zeigten kaum Wirkung gegen Bakterien. 2. Durch die Entdeckung von Antibiotika erschien die Erforschung alternativer Behandlungsmethoden von bakteriellen Infektionen unnötig. [25–28]

Heute ist bekannt, dass es zwei Typen der Photosensibilisierung gibt: Typ I, bei dem verschiedene Sauerstoffradikale durch einen Elektronentransfer vom Photosensibilisator gebildet werden, und Typ II, bei dem der Photosensibilisator über einen strahlungslosen Energietransfer molekularen Sauerstoff anregt. Dieser angeregte Sauerstoff ist hoch reaktiv und wird **Singulett-Sauerstoff** ( $^1\text{O}_2$ ) genannt. Während in der PDT die Typ II Photosensibilisierung dominiert, können in der PDI beide Typen zu einer erfolgreichen Inaktivierung der Mikroorganismen führen. Die Typ II

Photosensibilisierung ist allerdings erstrebenswerter, da der Photosensibilisator ähnlich einem Katalysator wirkt und nicht „verbraucht“ wird, wie es bei Typ I der Fall ist.

## **1.2 Photodynamische Inaktivierung von Mikroorganismen**

Sowohl in der Onkologie, als auch der Dermatologie gibt es bereits photodynamische Anwendungen, die als Standardtherapie eingesetzt werden. Da die PDI von Mikroorganismen im Vergleich zur PDT erst in den letzten Jahren größere Aufmerksamkeit bekam, kommt sie derzeit nur in wenigen Bereichen zum Einsatz. Der wohl prominenteste Gebrauch ist die photodynamische Behandlung von Parodontose in der Zahnmedizin [29]. [30]

Das Potential der PDI ist jedoch enorm. Im Gegensatz zu Antibiotika können durch die PDI nicht nur Bakterien, sondern auch Algen und Pilze bekämpft werden. So konnten verschiedene multiresistente Erreger bereits erfolgreich photodynamisch inaktiviert werden [31,32]. Ein weiterer bedeutender Vorteil der PDI gegenüber Antibiotika ist, dass die Gefahr der Resistenzbildung bei der PDI von Mikroorganismen äußerst gering ist. [30]

Dementsprechend hoch ist das Potential für photodynamische Applikationen. Mögliche Anwendungsgebiete reichen von diversen medizinischen Anwendungen bis hin zur Verhinderung der Bildung von Biofilmen im Denkmalschutz oder der Abwasseraufbereitung. Insbesondere für Krankenhäuser wären funktionalisierte Oberflächen, die sich durch die dauerhafte Ankopplung von Photosensibilisatoren selbst desinfizieren äußerst erstrebenswert. Andere mögliche Applikationen wären Wundauflagen oder Filtersysteme, die photodynamisch desinfizieren.

Auch die Aufbereitung von Abwasser mit Hilfe photodynamischer Desinfektion wurde bereits diskutiert und getestet [33–35]. Ebenso die PDI an Algen, als Schritt zur photodynamischen Inaktivierung von Biofilmen an Fassaden [36,37]. Seit den 1990er Jahren wurde eine Methode entwickelt und angewendet, die der PDI von Mikroorganismen sehr ähnlich ist, die Photokatalytische Inaktivierung von Mikroorganismen. Insbesondere auf den beiden oben erwähnten Gebieten, Abwasseraufbereitung und Biofilmbekämpfung, wurde und wird sie bereits getestet und angewendet. Die Verwendung von Titandioxid, insbesondere von Titandioxid Nanopartikeln, hat sich dabei besonders etabliert [38]. So gibt es bereits Titandioxid in Lebensmittelqualität (E171) auf dem Markt [39]. [38–43]

Allerdings wurden in den letzten Jahren die Notwendigkeit einer Alternative deutlich. Seit wenigen Jahren werden verschiedene negative Auswirkungen, insbesondere karzinogene Eigenschaften von Titandioxid ausführlich diskutiert. Es besteht beispielsweise der Verdacht, dass durch

Nahrungsmittel aufgenommenes Titandioxid das Wachstum von Darmkrebs unterstützt [39] und Titandioxid Nanopartikel genotoxisch auf Epithelzellen wirken [44]. Titandioxid Staub wurde von der *International Agency for Research on Cancer* der WHO bereits als Karzinogen deklariert [45]. [39,44–47]

Ferner wurde von der französischen Behörde „Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail“ (ANSES) ein CLH-Report mit einem Vorschlag für die harmonisierte Einstufung und Kennzeichnung von Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) als „wahrscheinlich krebserzeugend beim Menschen“ (Kategorie 1B) / „kann beim Einatmen Krebs erzeugen“ (H350i) erarbeitet. Dies bedeutet, dass auch eine zurzeit gängig verwendbare Substanz unter besondere Beobachtung gerät und auf ihre Karzinogenität überprüft wird. [48,49]

Die PDI von Mikroorganismen hat das Potential, das derzeitige Anwendungsspektrum der Photokatalytischen Inaktivierung abzudecken. Dabei ist das Gesundheitsrisiko für Menschen äußerst gering, da durch die Wahl des Photosensibilisators stark beeinflusst werden kann welche Zellen bekämpft werden. In der PDI werden ausschließlich Photosensibilisatoren verwendet, die nicht gegen menschliche oder tierische Zellen wirken. [30,50]

## **1.3 Spektroskopische Untersuchung des Photodynamischen Effekts**

Die optisch-spektroskopische Charakterisierung von Photosensibilisatoren ist seit den Anfängen der Erforschung des Photodynamischen Effekts zu Beginn des 20. Jahrhunderts ein wichtiges Werkzeug. Sie dient der Entwicklung von Photosensibilisatoren und der Erforschung der Wirkmechanismen des Photodynamischen Effekts. Neben der Fluoreszenz des Photosensibilisators spielt die Phosphoreszenz von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$  Lumineszenz) eine wichtige Rolle. Die strahlende Desaktivierung des molekularen Sauerstoffs ist mehrfach verboten, weshalb die Emission eines Photons sehr unwahrscheinlich ist. Diese Lumineszenz liegt im nahen Infrarotbereich und ist äußerst schwach. Die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz war bis in die 1970er Jahre nicht möglich und ist auch heute noch eine große Herausforderung.

Wie in Kapitel 2.2 noch ausführlich gezeigt wird, beinhaltet die Kinetik der Lumineszenz von  $^1\text{O}_2$  wertvolle Informationen über die Mikroumgebung des Photosensibilisators. Die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und die Bestimmung ihrer Kinetik *in vitro* unter Bedingungen, die für eine Anwendung der PDT relevant sind, ist erst seit den späten 2000er Jahren möglich [51,52].

Der direkte Nachweis von  $^1\text{O}_2$  über die zeitaufgelöste Detektion der schwachen  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz war lange Zeit auf Suspensionen beschränkt. 2013 wurde von Schlothauer et al. eine Untersuchung zur Verteilung von Photosensibilisatoren in Schweinehaut publiziert. In dieser Publikation wurde erstmalig zeitaufgelöste  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz gezeigt, die unter *in situ* Bedingungen auf einer Oberfläche detektiert wurde. Zudem wurde durch einen 2D-Scan der zeitaufgelösten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz erstmalig die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz als bildgebendes Verfahren eingesetzt [53].

Durch den hohen Aufwand an Technik und das notwendige breite interdisziplinäre Fachwissen ist derzeit in nur wenigen Arbeitsgruppen weltweit die zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an Bakterienproben möglich. Zu betonen ist, dass bisher ausschließlich Messungen in Suspensionen publiziert wurden. [54–56]

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit wird die orts- und zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz für die Bewertung der PDI von Mikroorganismen nutzbar gemacht und ihre Möglichkeiten ausgetestet. Insbesondere wird ein Messaufbau zum direkten Nachweis von  $^1\text{O}_2$  durch die zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an kultivierten Mikroorganismen auf Oberflächen konzipiert, aufgebaut und getestet. Dabei stehen folgende Fragen im Mittelpunkt:

- Ist die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an kultivierten Mikroorganismen auf Oberflächen möglich?
- Ist die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf Oberflächen mit genügend hohen Signal-Rausch-Verhältnis möglich, dass eine Analyse der Lumineszenzkinetik verwertbare Informationen zum Zustand des Systems liefert?
- Kann ein Zusammenhang des Wachstums der Mikroorganismen mit der Kinetik der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz gefunden werden?

Um diese Fragen zu beantworten beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Planung, Konstruktion und Charakterisierung eines Messplatzes zur orts- und zeitaufgelösten Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und spektralaufgelöster Fluoreszenz auf Oberflächen. Dieser Messplatz soll eine bildgebende Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz ermöglichen. Dafür soll eine Fläche abgerastert werden und an jedem Punkt soll eine zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz stattfinden. Durch die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums an jedem Punkt soll später eine Korrelation von Photosensibilisator Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz ermöglicht werden.



Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt grundlegende Untersuchungen zur Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf Nährböden. Dabei sollen Grundlagen für die Durchführung und Auswertung von Messreihen an kultivierten Mikroorganismen erarbeitet werden.

Im dritten Teil werden Untersuchungen vorgestellt, in denen die oben formulierten Fragen für das Bakterium *Escherichia coli*, den Dermatophyten *Trichophyton rubrum*, den Schimmelpilzes *Scopulariopsis brevicaulis* und die Alge *Chlorella fusca* var. *vacuolata* beantwortet werden.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Sauerstoff

Molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) spielt eine der wichtigsten Rollen für das Ökosystem und das Leben auf der Erde. Für viele Lebewesen, per Definition für alle aeroben Lebewesen, ist Sauerstoff lebensnotwendig. Er beschützt lebende Organismen durch die Absorption harter UV-Strahlung (UV-C) aus dem Emissionsspektrum der Sonne, wodurch die UV-B absorbierende Ozonschicht generiert wird und stellt aeroben Lebewesen Energie durch Atmung zur Verfügung. [57]

Im Folgenden soll das Sauerstoffmolekül, der Singulett-Sauerstoff, der in dieser Arbeit die Schlüsselrolle spielt, und dessen Generierung und Deaktivierung näher betrachtet werden.

#### 2.1.1 Molekularer Sauerstoff und Sauerstoffradikale

Einer der Gründe für die enorme Wichtigkeit des Sauerstoffs für das Ökosystem der Erde ist, dass molekularer Sauerstoff in der Natur hauptsächlich als gasförmiges Biradikal vorkommt. Wegen des biradikalen Charakters ist molekularer Sauerstoff bei Raumtemperatur reaktionsträge. Es sind entweder hohe Aktivierungsenergien oder die Bildung **aktivierter Sauerstoffspezies** (*Reactive Oxygen Species*, ROS) notwendig, um effiziente Oxidationsprozesse zu starten.

Es gibt eine große Vielfalt von ROS. Die Wichtigsten sind **Singulett-Sauerstoff** ( $^1O_2$ ), das **Sauerstoffanionradikal** und seine protonierte Form ( $^{\bullet}O_2^- / HO_2^{\bullet}$ ), das **Hydroxylradikal** ( $OH^{\bullet}$ ), **Wasserstoffperoxid** ( $H_2O_2$ ), **Hydroperoxiradikale** ( $HO_2^{\bullet}$ ), **Peroxiradikale** ( $RO_2^{\bullet}$ ) sowie **Stickoxide** ( $NO_x^{\bullet}$ ). Neben diesen und weiteren ROS gibt es Zwischenprodukte, die bei verschiedenen enzymatischen Umsetzungen der ROS auftreten. [28,58]

In lebenden Organismen spielen ROS eine große Rolle. Sie entstehen bei vielen Prozessen als Nebenprodukte, so beispielsweise bei verschiedenen Elektronentransportketten. Antioxidantien und andere ROS-Regulierungsmechanismen sorgen im Normalfall für ein stabiles Gleichgewicht. Die übermäßige Produktion von ROS wird als Ursache verschiedener Krankheiten wie Krebs, Insulinresistenz und Diabetes mellitus aber auch für Alterungserscheinungen vermutet. Gegenüber

den negativen Auswirkungen auf das Leben treten ROS auch positiv in Erscheinung. Beispiele dafür sind die Rolle bei der Transkription und der genetischen Stabilisierung der DNS, die Regulierung von Gefäßwachstum durch ROS und die Rolle im Immunsystem durch die Aktivierung von Phagozyten. [28,59–62]

Um den Ursachen des außergewöhnlichen Verhaltens von Sauerstoff auf den Grund zu gehen, werden im Folgenden zunächst die ersten elektronischen Zustände und Übergänge zwischen diesen Zuständen diskutiert.

Eine Ursache für die Eigenschaften des Sauerstoffs liegt in der nicht geschlossenen äußeren  $\pi$ -Elektronen Schale. Ein „molekulares“ Analogon der Hund’schen Regeln führt zu zwei ungepaarten Elektronen in den äußeren  $\pi^*$ -Molekülorbitalen und damit zu paralleler Spin Orientierung im Grundzustand  $X^3\Sigma_g^-$ .

Die ersten beiden angeregten Zustände ergeben sich aus den vier Alternativen der Verteilung der zwei Elektronen in die beiden entarteten  $\pi_p^*$ -Molekülorbitale:



Abbildung 3: Besetzungsdiagramm der  $\pi_{p_z}^*$  und  $\pi_{p_y}^*$  Orbitale des molekularen Sauerstoffs.

Die ersten beiden angeregten Zustände sind demnach Singulett-Zustände und es sollten in Dipolnäherung keine strahlenden Übergänge zwischen ihnen und dem Grundzustand erlaubt sein. Trotz zahlreicher weiterer elektronischer Zustände (siehe Abbildung 2, erstellt mit Daten aus [63,64]) weist erst der Übergang  $B^3\Sigma_u^- \leftarrow X^3\Sigma_g^-$  ein nennenswertes elektronisches Übergangsdipolmoment auf. Die korrespondierenden Absorptionsbanden sind die Schuhmann-Runge-Banden, eben jene Absorptionsbanden, die für den UV-Schutz sorgen. [65]

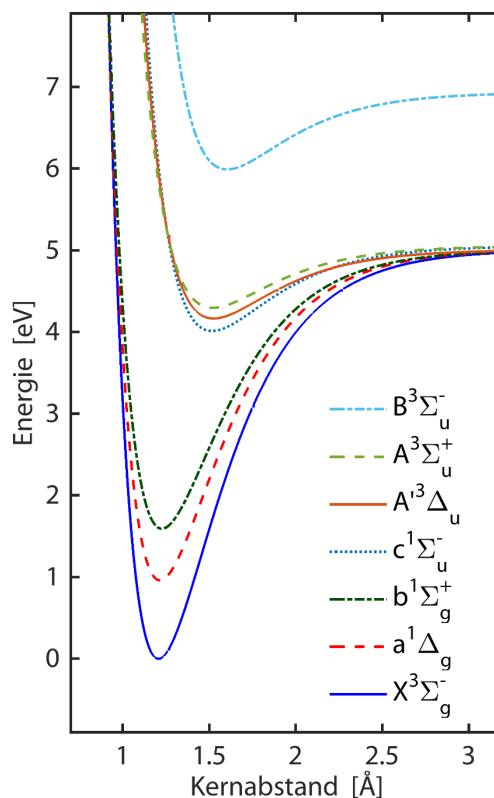


Abbildung 2: Potentialkurven des Grundzustands und der ersten angeregten Zustände des Sauerstoffmoleküls. Erstellt mit Daten aus [63,64].

Die paramagnetischen Eigenschaften aufgrund der ungepaarten Spins im Grundzustand, die hohe Anzahl an elektronischen Zuständen ohne erlaubte Übergänge und die Existenz zweier niederenergetischer, metastabiler Singulett-Zustände lassen sich hier bereits als Ursachen der besonderen Eigenschaften des Sauerstoffs zusammenfassen.

Da hier der Singulett-Sauerstoff, also molekularer Sauerstoff im  $a^1\Delta_g$ -Zustand, von zentralem Interesse ist, werden im Folgenden nur noch die niedrigsten drei elektronischen Zustände des  $O_2$  und mögliche Übergänge diskutiert. In elektronischer Dipolnäherung sind Übergänge zwischen allen drei Zuständen ( $X^3\Sigma_g^-$ ,  $a^1\Delta_g$  und  $b^1\Sigma_g^+$ ) strikt verboten. Alle Zustände weisen eine gerade Symmetrie auf, eine Änderung der Symmetrie wäre aber für einen erlaubten Übergang notwendig. Die Übergänge a-X und b-a sind zusätzlich verboten, da sich die Projektion des Gesamtdrehimpulses der Elektronen auf die Kernverbindungsachse um 2 ändern würde ( $\Delta\Lambda=2$ , erlaubt ist  $\Delta\Lambda=0, \pm 1$ ). Bei den Übergängen a-X und b-X kommt eine Änderung der Multiplizität hinzu, welche ebenfalls verboten ist.

Trotz des dreifachen Verbots des a-X Übergangs ist die Detektion der Lumineszenz eben dieses Übergangs der zentrale Punkt dieser Arbeit. Wieso es dennoch möglich ist, eine Lumineszenz zu detektieren, wird im Folgenden erklärt.

Für ein freies, isoliertes  $O_2$  Molekül im  $b^1\Sigma_g^+$  Zustand wurden strahlende Ratenkonstanten von  $k_{b-a} = 1,7 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ ,  $k_{b-X} = 8,9 \cdot 10^{-2} s^{-1}$  und  $k_{a-X} = 2,6 \cdot 10^{-4} s^{-1}$  errechnet [57,66]. Diese Übergänge sind allerdings sehr anfällig für Störungen durch Lösungsmittelmoleküle beziehungsweise molekulare Komplexbildungen. So kommt es zu starken Änderungen der oben genannten Raten in Lösungsmitteln. Während der b-X Übergang kaum beeinflusst wird, kann es beim Übergang a-X zu einer Verstärkung um den Faktor  $10^4$  kommen. Unterschiede zwischen verschiedenen Lösungsmitteln können dabei einen Faktor von 20 erreichen. Der Übergang b-a wird sogar um den Faktor  $10^5$  verstärkt. [57,65–67]

Trotz des Verbots eines elektronischen Dipolübergangs kommt es demnach in der Realität durchaus zu nicht vernachlässigbaren Übergängen zwischen den ersten beiden angeregten elektronischen Zuständen und dem Grundzustand des Sauerstoffmoleküls. Durch den dominanten b-a Übergang wird der  $b^1\Sigma_g^+$ -Zustand in den  $a^1\Delta_g$ -Zustand entleert. Auch die Desaktivierung dieses Zustands in den Grundzustand  $X^3\Sigma_g^-$  erscheint durchaus wahrscheinlich. An dieser Stelle sollte allerdings angemerkt werden, dass ein a-X Übergang demnach maximal eine Rate im Bereich von  $10^0 s^{-1}$  erreichen kann. Im Vergleich zu anderen strahlenden Übergängen, wie der Fluoreszenz mit Raten im Bereich von  $10^8 s^{-1}$ , ist diese Rate immer noch verschwindend gering.

Voraussetzung für die Besetzung des  $a^1\Delta_g$ -Zustands und einem strahlenden a-X Übergang ist die Anregung des Sauerstoffs. Aufgrund der oben diskutierten quantenmechanischen Verbote ist die Wahrscheinlichkeit für eine direkte Anregung des Sauerstoffs verschwindend gering. Wie bereits erwähnt, findet eine effiziente Absorption von Licht erst im UV-C Bereich der Schumann-Runge Absorptionsbanden statt. Allerdings kommt es nach UV-C Absorption meist zu einer Dissoziation des  $O_2$ . Diese Spaltung führt zur Generierung der Ozonschicht, aber nicht zu einer Besetzung des  $a^1\Delta_g$ -Zustands. Wie es trotzdem zu einer effizienten Generierung von Singulett-Sauerstoff kommt, wird im folgenden Abschnitt erklärt.

### 2.1.2 Generierung und Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff

Es steht die Frage im Raum, wie trotz mehrfacher quantenmechanischer Verbote molekularer Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff angeregt werden kann. Aus den oben diskutierten Übergangsraten ist ersichtlich, dass eine Anregung durch Absorption von NIR-Licht zwar möglich, aber sehr ineffizient ist. Es gibt eine große Vielfalt von chemischen Reaktionen bei denen ROS, und dabei unter anderem auch Singulett-Sauerstoff, entstehen. Der bekannteste chemische Mechanismus zur Generierung von Singulett-Sauerstoff ist dabei wohl die Reaktion von Natriumhypochlorit mit Wasserstoffperoxid [62,68]. Im Folgenden soll aber der Mechanismus beschrieben werden, der maßgeblich für den Photodynamischen Effekt ist, die Photosensibilisierung.

Es wird zwischen zwei Typen der Photosensibilisierung unterschieden. Bei Typ I Reaktionen erfolgt die Radikalbildung durch einen Elektronentransfer zwischen angeregtem Photosensibilisator und Sauerstoff oder Substrat [69]. Interessanter sind Typ II Reaktionen, da hier die Bildung von ROS durch einen Anregungsenergietransfer zwischen Photosensibilisator und Sauerstoff stattfindet. Dies hat die Folge, dass ein Photosensibilisator ähnlich einem Katalysator wirkt und entsprechend nicht „verbraucht“ wird. [28,62,70]

Bei Typ II Photosensibilisierung gibt ein Photosensibilisator seine durch Lichtabsorption erhaltene Anregungsenergie aus seinem ersten angeregten Triplett-Zustand an den molekularen Sauerstoff ab, wodurch dieser in den angeregten  $a^1\Delta_g$ -Zustand übergeht. Dieser Prozess und die ihm zu Grunde liegenden photophysikalischen Grundlagen werden im Folgenden ausführlicher betrachtet.

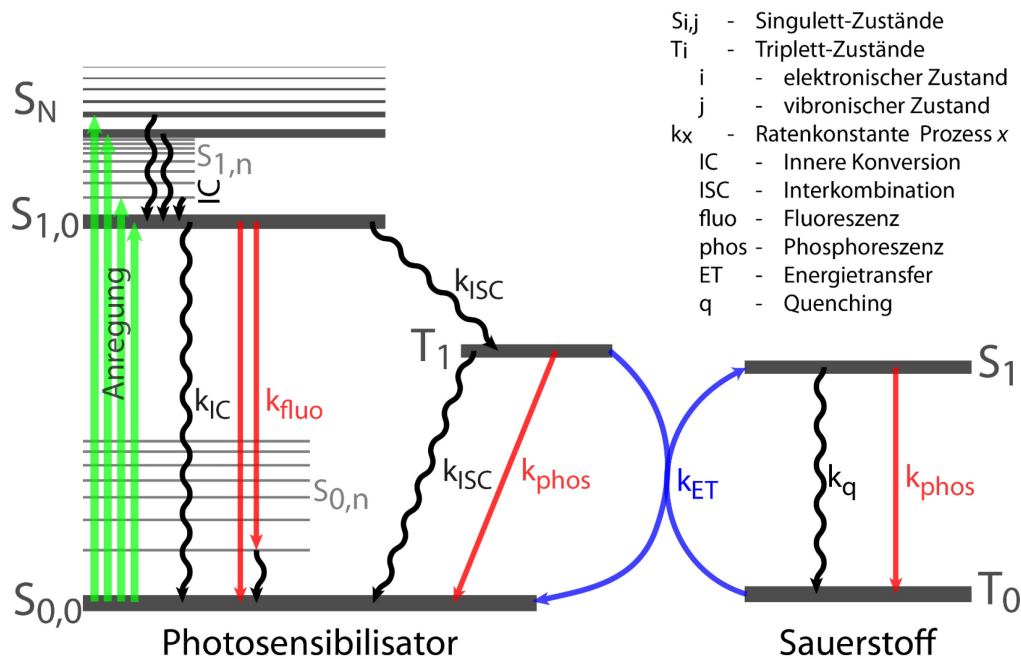


Abbildung 4: Jablonski Diagramm zur Darstellung der elektronischen und vibronischen Zustände von Photosensibilisator und Sauerstoff und aller relevanten Prozesse.

### Anregung und Desaktivierung des Photosensibilisators

Die Anregung des Photosensibilisators erfolgt durch die Absorption von Licht. Dabei geht das Molekül von seinem Singulett-Grundzustand in einen höheren Zustand gleicher Multiplizität ( $S_{m,n} \leftarrow S_{0,0}$ ) über. Welcher Zustand eingenommen wird hängt dabei von der Wellenlänge des absorbierten Lichts und den Franck-Condon-Faktoren der möglichen Übergänge ( $FC_{m,n \leftarrow 0,0}$ ) ab. Sollte sich der Photosensibilisator nach der Anregung nicht direkt im vibronischen Grundzustand des ersten angeregten elektronischen Zustands ( $S_{1,0}$ ) befinden, folgt auf die Absorption die innere Konversion, also eine strahlungslose Relaxation, in den eben diesen Zustand ( $S_{m,n} \rightarrow S_{1,0}$ ).

Bei der Desaktivierung des vibronischen Grundzustands des ersten angeregten elektronischen Zustands ( $S_{1,0}$ ) konkurrieren verschiedene Prozesse. Der Übergang in den elektronischen Grundzustand ( $S_{1,0} \rightarrow S_{0,n}$ ) kann durch innere Konversion oder durch Fluoreszenz, also spontane Emission von Licht, stattfinden. In Anwesenheit eines äußeren Lichtfeldes kann es auch zu einer Desaktivierung durch stimulierte Emission kommen. Bei strahlender Desaktivierung kann dabei zunächst ein höherer vibronischer Zustand des elektronischen Grundzustands eingenommen werden ( $S_{1,0} \rightarrow S_{0,n}$ ) worauf eine innere Konversion stattfindet ( $S_{0,n} \rightarrow S_{0,0}$ ). Ausschlaggebend für die Übergangswahrscheinlichkeiten sind auch hier die entsprechenden Franck-Condon Faktoren.

Ein weiterer Desaktivierungskanal des  $S_{1,0}$ -Zustands ist die Interkombination (**ISC**, *Intersystem Crossing*), also die Besetzung des ersten angeregten Triplett-Zustands ( $S_{1,0} \rightarrow T_{1,0}$ ). Dabei koppelt der

$S_{1,0}$ -Zustand mit einem entarteten Schwingungszustand des  $T_1$ -Zustands woraufhin es zu einer Schwingungsrelaxation in den  $T_{1,0}$ -Zustand kommt. Voraussetzung für hohe ISC-Quantenausbeuten sind ein geringer energetischer Abstand zwischen  $S_1$  und  $T_1$  und insbesondere eine starke Spin-Bahn-Kopplung. Diesen Voraussetzungen genügen Moleküle mit ausgedehntem  $\pi$ -Elektronensystem, wie aromatische Kohlenwasserstoffe. [28,71–75]

Desaktiviert wird der  $T_1$ -Zustand entweder strahlend oder nichtstrahlend in den  $S_0$ -Zustand oder intermolekular, also durch Anregungsenergietransfer. Die Desaktivierung in den Singulett-Grundzustand geschieht über ISC (nichtstrahlend) oder Phosphoreszenz (strahlend), ist aber in den meisten Fällen sehr unwahrscheinlich, da im Falle einer effizienten  $T_1$  Population der energetische Abstand zwischen dem  $T_1$ -Zustand und dem  $S_0$ -Grundzustand zu hoch ist. [28,74,75]

### **Anregungsenergietransfer vom Photosensibilisator zu molekularem Sauerstoff**

Wahrscheinlicher ist die Desaktivierung durch Anregungsenergietransfer vom Photosensibilisator zum molekularem Sauerstoff. Dabei gibt der Photosensibilisator die Anregungsenergie ab und geht aus dem  $T_1$ -Zustand in den  $S_0$ -Zustand über und der  $O_2$  nimmt die Energie auf und geht aus dem  $T_0$ -Zustand in den  $S_1$ -Zustand über. Dies soll im Folgenden etwas präziser beschrieben werden.

Diese Form des Anregungsenergietransfers ist ein Sonderfall der von Förster beschriebenen Theorie für „zwischenmolekulare Energiewanderung“ bei schwacher Kopplung [76]. Da hier Donator (der Photosensibilisator) und Akzeptor (der molekulare Sauerstoff) im Initialzustand in Triplet-Konfiguration vorliegen und im Endzustand beide in Singulett-Konfiguration vorliegen, ist ein Energietransfer-Prozess erlaubt. Der Spin des Gesamtsystems bleibt erhalten. Ein Energietransfer durch Coulomb-Wechselwirkung, wie beispielsweise beim Fluoreszenz Resonanz Energietransfer, ist allerdings höchst unwahrscheinlich. Sowohl der Übergang im Donator als auch der im Akzeptor ist spinverboten. Der hier ablaufende Energietransferprozess wurde von Dexter erstmalig ausführlich diskutiert [77] und heißt deshalb auch Dexter-Transfer. [76–80]

Die Rate des Dexter-Transfers  $k_{ET}$  ergibt sich aus:

$$k_{ET} = K \cdot J \cdot e^{-2r/L}$$

Dabei beschreibt  $J$  den spektrale Überlapp zwischen der Emission des Donators und der Absorption des Akzeptors,  $r$  ist der Abstand zwischen Donator und Akzeptor und  $L$  eine Konstante.  $K$  ist proportional zum Überlapp der beteiligten Molekülorbitale. Die Rate ist also hauptsächlich abhängig von dem energetischen Abstand zwischen dem  $T_1$ -Zustand des

Photosensibilisators und dem  $S_1$ -Zustand des Sauerstoffs und vor allem dem Abstand, der so gering sein muss, dass ein signifikanter Überlapp der Molekülorbitale vorhanden ist. [58,78,79]

Es handelt sich demnach um eine Stoßwechselwirkung. Der Mechanismus mit dem die Anregungsenergie hier übertragen wird, ist ein Elektronenaustausch. Am einfachsten lässt sich der Vorgang in einem Schema darstellen (siehe Abbildung 5), bei dem nur das höchste besetzte Molekülorbital (*Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO) und das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO) betrachtet werden. Einflüsse auf diesen Prozess, vor allem der Einfluss der Diffusion von Photosensibilisator und Sauerstoff werden im Abschnitt 2.2 noch ausführlich behandelt.

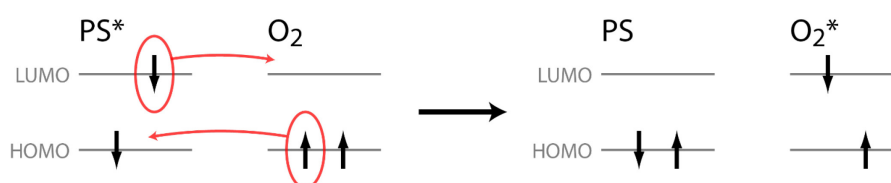


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Dexter Energietransfers zwischen Photosensibilisator und molekularem Sauerstoff.

Hier wird nur der in den meisten Fällen dominante Prozess des Stoßenergietransfers diskutiert. Da der angeregte Photosensibilisator (im  $S_1$  oder  $T_1$ -Zustand) und der molekulare Sauerstoff einen Stoßkomplex bilden, in dem sich verschiedene quantenmechanische Zustände mischen, gibt es durchaus andere Interaktionsmechanismen. Da diese aber sehr komplex sind und im weiteren Verlauf dieser Arbeit keine Rolle spielen, wird hier nur auf entsprechende Literatur [57,67] verwiesen.

### Desaktivierung und Quenching von Singulett-Sauerstoff

Nach der Anregung von Singulett-Sauerstoff findet eine Vielzahl von intra- und intermolekularen oder chemischen Prozessen statt. Die Wichtigsten und Interessantesten werden im Folgenden aufgeführt und diskutiert. Dabei wird meist der Fall von Singulett-Sauerstoff in Lösungsmitteln diskutiert. Im Gegensatz zu den im Verlauf dieser Arbeit auftauchenden inhomogenen Systemen sind die Eigenschaften von Singulett-Sauerstoff in homogenen Systemen wie Gas oder Lösungsmittel ausführlich untersucht worden. [30,70,81–83]

Intermolekulare Quenchingmechanismen laufen meist über die Bildung von Stoßkomplexen ab. Der bei Quenchern mit hohem Oxidationspotential und energetisch hohen Triplett-Zuständen dominierende Prozess ist der Transfer der elektronischen Anregungsenergie an vibronische Übergänge des Lösungsmittelmoleküls. Dabei wird die elektronische Anregungsenergie des



Singulett-Sauerstoffs in vibronische oder Rotationsenergie des Quenchers umgewandelt. Besonders effizient ist dieser Energietransfer bei Hydriden, da X-H Bindungen hochfrequente Schwingungen aufweisen, sodass zwei oder drei Quanten genügen um die Anregungsenergie des Singulett-Sauerstoff-Moleküls zu absorbieren [57]. Aus diesem Grund sind Moleküle mit C-H oder O-H Bindungen bessere Quencher als Moleküle ohne solche Bindungen. [57,62,66,67,84–88]

Bei Quenchern mit energetisch hohen Triplett-Zuständen und geringem Oxidationspotential dominiert hingegen ein Ladungstransfer des Singulett-Sauerstoffs an den Quencher. Dieser Prozess dominiert auch bei verschiedenen biologisch relevanten Quenchern wie Vitamin B12 [87], Vitamin E [86] oder dem Quenching durch Chlorophylle [88] oder Porphyrine [88]. [67,86–88]

Unabhängig vom Oxidationspotential kommt es bei Quenchern mit Triplett-Zuständen die energetisch unter dem  $a^1\Delta_g$ -Zustand des Sauerstoffs liegen zu teils sehr effizienten Anregungsenergietransfer-Prozessen. Das wohl meist untersuchte und prominenteste Beispiel für dieses Quenching ist die Wirkung von Carotinoiden als Antioxidant [89–91]. [57,62,66,67,84–91]

Bei intramolekularen Prozessen dominiert der strahlende  $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  Übergang. Die Emissionsbande dieser Phosphoreszenz liegt im Nahinfrarot (NIR) bei einer Wellenlänge von etwa 1269 nm. Das Spektrum, aber auch die Intensität der Phosphoreszenz sind stark von der Umgebung abhängig. Die Ursache dafür liegt in der starken Anfälligkeit der Übergänge  $b^1\Sigma_b^- \rightarrow a^1\Delta_g$  und  $a^1\Delta_g \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  für Störungen durch Lösungsmittel oder molekulare Komplexbildungen, wie bereits in Abschnitt 2.1.1 erwähnt. Die spektrale Verschiebung des Emissionsmaximums kann in Lösungsmitteln mehrere Nanometer betragen, in Kohlenstoffdisulfid beträgt sie etwa 9 nm [66]. Noch stärker sind äußere Einflüsse aber auf die Intensität der Phosphoreszenz. Die strahlende Ratenkonstante  $k_r^{a-X}$  kann in Lösung um den Faktor  $10^4$  höher als in der Gasphase sein. Während die strahlende Ratenkonstante für ein isoliertes Molekül bei gerade einmal  $2,6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  liegt, variiert sie in verschiedenen Lösungsmitteln zwischen  $0,209 \text{ s}^{-1}$  in Wasser (zwei O-H Bindungen) und  $3,14 \text{ s}^{-1}$  in Kohlenstoffdisulfid (keine H-Bindung). Innerhalb von verschiedenen Lösungsmitteln kann die strahlende Ratenkonstante demnach um einen Faktor 20 variieren. Zu bedenken ist hier aber, dass dies nur einer von vielen Faktoren ist, der die Intensität der Phosphoreszenz, wie sie im späteren Verlauf dieser Arbeit detektiert und ausgewertet wird, ausmacht. [57,66,67]

Wie diese Phosphoreszenz detektiert wird, welche Informationen daraus entnommen werden können und welche anderen Methoden der Detektion von Singulett-Sauerstoff es gibt, ist Thema des Kapitels 2.2.

Chemisches Quenching ist ein weiterer, in vielen Systemen dominanter Deaktivierungskanal von Singulett-Sauerstoff. Dabei werden meist Peroxide durch die Reaktion des Singulett-Sauerstoffs mit ungesättigten Verbindungen organischer Moleküle gebildet. Dies führt in biologischer Umgebung zur Schädigung von unter anderen Membranen [62,92], DNS [62,93] und Mitochondrien [94,95]. [58,62,92–97]

Alle hier aufgeführten Deaktivierungsprozesse konkurrieren miteinander. Die strahlende Desaktivierung ist in der Gasphase meist der dominante Prozess. Sobald aber Quencher im System vorhanden sind, beispielsweise in Form eines Lösungsmittels, dominieren die physikalischen (intra- oder intermolekulare) oder chemischen Quenchingprozesse. Insbesondere in Systemen mit einem Lösungsmittel, das wenig quencht, wie beispielsweise Kohlenstoffdisulfid, spielt auch das Quenching von Singulett-Sauerstoff durch molekularen Sauerstoff oder durch Photosensibilisatoren eine nennenswerte Rolle. Die strahlende Desaktivierung wird in solchen Systemen zwar zur Detektion verwendet, ist aber ansonsten vernachlässigbar gegen die anderen Quenchingprozesse. [62,92–98]

In biologischen Systemen ist eine Vielzahl verschiedener Quencher vorhanden. Das Verhältnis der verschiedenen Quenchingmechanismen ist dabei stark vom Ort der Generierung des Singulett-Sauerstoffs abhängig und lässt sich nur schwer bestimmen.

## 2.2 Nachweis und Charakterisierung von Singulett-Sauerstoff

Singulett-Sauerstoff kann auf verschiedene Weisen detektiert werden. Dabei muss in nicht-gasförmigen Systemen unterschieden werden zwischen der einzigen direkten Methode, der Messung der Phosphoreszenz bei 1269 nm, und verschiedenen indirekten Methoden.

Im Folgenden werden kurz die indirekten Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen vorgestellt, gefolgt von einer ausführlichen Diskussion der Detektion der Singulett-Sauerstoff Phosphoreszenz.

### Indirekter Nachweis von Singulett-Sauerstoff

Alle indirekten Methoden basieren auf einer Reaktion der reaktiven Sauerstoffspezies mit einem Monitormolekül woraufhin sich eine messbare physikalische Eigenschaft dieses Moleküls ändert. Sich ändernde Eigenschaften können Absorption, Fluoreszenz, Chemolumineszenz oder über Elektronenspinresonanz (ESR) nachgewiesene, messbare Änderungen einer Molekülbindung sein. Singulett-Sauerstoff als paramagnetisches Molekül sollte auch direkt über ESR-Spektroskopie zu detektieren sein, allerdings gelang das bislang nur in der Gasphase [99].

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl verschiedener Monitormoleküle, die für verschiedene Einsätze in verschiedenen Systemen entwickelt wurden. Dabei wird nicht immer nur Singulett-Sauerstoff detektiert, auch verschiedene andere ROS können mit variierender Selektivität indirekt nachgewiesen werden. Sehr weit verbreitet sind molekulare Systeme, die aus einer Dyade mit einem Fluorophor (z.B. Fluoreszin) und einem Singulett-Sauerstoff-Sensor bestehen. Bevor der Sensor oxidiert wird, quencht er die Fluoreszenz des Fluorophors. Durch die Reaktion des Sensors mit Singulett-Sauerstoff wird die Fluoreszenz regeneriert, sodass ein Anstieg der Fluoreszenzintensität detektiert werden kann [30]. Eines der bekanntesten Beispiele dafür ist der kommerziell erhältliche *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG). Diese Sensorsysteme bieten den Vorteil, dass mit der Fluoreszenz ein Signal zu detektieren ist, das im sichtbaren Bereich des Spektrums liegt und leicht zu messen ist. Es hat eine hohe Quanteneffizienz und es stehen verschiedene sehr sensible Detektoren zur Verfügung. [30,100–102]

### Direkter Nachweis von Singulett-Sauerstoff

Der direkte Nachweis von Singulett-Sauerstoff über die Detektion der schwachen Phosphoreszenz bei 1270 nm ist technisch äußerst anspruchsvoll. Trotzdem besteht mittlerweile Konsens, dass der direkte Nachweis über die Phosphoreszenz den indirekten Methoden überlegen ist [30,57,67,96]. Der Grund dafür liegt in mehreren Nachteilen aller indirekten Methoden. Allgemein führt die Notwendigkeit eines Monitormoleküls zu einer Änderung des Systems, eben um dieses

Monitormolekül. Es muss also die Interaktion des Monitormoleküls mit dem System zusätzlich untersucht werden. Insbesondere in komplexeren Systemen gibt es teilweise gravierende Interaktionen. In einer Zelle beispielsweise ist die Lokalisation des Sensors bei Weitem nicht homogen, wenn er denn überhaupt in die Zelle aufgenommen wird. SOSG kann nur unter bestimmten Umständen in eine Zelle aufgenommen werden, zudem ist er in oxidiertem Zustand selbst ein Photosensibilisator, generiert also Singulett-Sauerstoff. Außerdem ist SOSG innerhalb der Zelle in den Mitochondrien lokalisiert, sodass das Fluoreszenzsignal hauptsächlich von der Lokalisierung des Photosensibilisators und der lokalen Sauerstoffkonzentration abhängt. [30]

## 2.2.1 Grundlagen der direkten Detektion der Singulett-Sauerstoff

### Phosphoreszenz

Wie bereits in Abschnitt 2.1.1 diskutiert, ist der strahlende  $a^1\Delta_u \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  Übergang auf Grund des dreifachen quantenmechanischen Verbots sehr unwahrscheinlich. Zudem sind die Übergangswahrscheinlichkeit und das Quenching von Singulett-Sauerstoff sehr stark vom System abhängig. Dies äußert sich in sehr geringen Phosphoreszenz-Quantenausbeuten, die für jedes System individuell sind. Sie variieren stark und sind nur in wenigen Fällen mit zufriedenstellender Genauigkeit zu bestimmen. In der Literatur können Werte im Bereich von  $10^{-4}$  und maximal im Bereich von  $10^{-2}$  für Lösungsmittel mit hoher strahlender Ratenkonstante gefunden werden [103]. [30]

Insbesondere in komplexen Systemen ist die Kinetik der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz aussagekräftiger als ihr Spektrum. Allerdings ist die spektral aufgelöste Detektion von besonderem Interesse für die Identifikation potentieller Störeinflüsse. In dieser Arbeit soll aber die zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz in Verbindung mit der spektral aufgelösten Fluoreszenz auf Oberflächen als Methode untersucht werden, deshalb wird im Folgenden nicht weiter auf die spektralaufgelöste Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und ihre Aussagekraft eingegangen.

Bei der Detektion der Phosphoreszenz des  $a^1\Delta_u \rightarrow X^3\Sigma_g^-$  Übergangs handelt es sich also per se um den Nachweis eines sehr schwachen Signals. Ein weiteres Problem stellt die spektrale Position der Phosphoreszenz dar. Abbildung 6 zeigt das Spektrum der Singulett-Sauerstoff Phosphoreszenz in Ethanol. Obwohl die Änderung der spektralen Lage um bis zu 9 nm in den meisten Fällen vernachlässigbar ist, stellt der spektrale Bereich, der NIR Bereich, ein Problem dar. Es gibt verschiedene Halbleiter (Indiumgalliumarsenid, Germanium, Bleisulfid), die in diesem spektralen Bereich Licht absorbieren können. Die Detektion ist aber mit starkem Rauschen verbunden im Vergleich zur Detektion von sichtbarem Licht. Die Hauptursachen für dieses Rauschen sind die

vergleichsweise geringe Bandlücke und eine geringe Detektionseffizienz. Dadurch weisen NIR Detektoren zwangsläufig ein stärkeres Dunkelrauschen auf.

Klassische Halbleiterdioden finden deshalb heutzutage kaum noch Anwendung. Das Signal-Rausch-Verhältnis bei Detektionsmethoden, die auf Photonenzählung basieren, sind deutlich höher. Das bisher beste Signal-Rausch-Verhältnis bei der zeitaufgelösten Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz kann mit der Methode der zeitkorrelierten Mehrphotonenzählung erzielt werden. Bei dieser Methode werden in einem Messzyklus nach dem Anregungspuls mehrere Photonen gezählt und nach der zeitlichen Differenz zwischen Detektion und Anregungspuls in ein Histogramm einsortiert. Durch hohes Dunkelrauschen und lange Messfenster im Bereich von  $100\ \mu\text{s}$  ist die Detektionswahrscheinlichkeit für ein Rauschphoton sehr hoch. Im Gegensatz zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung wird durch die Registrierung mehrerer Photonen die Wahrscheinlichkeit deutlich verringert, dass ein Messzyklus durch ein Rauschphoton blockiert wird. [51,52]

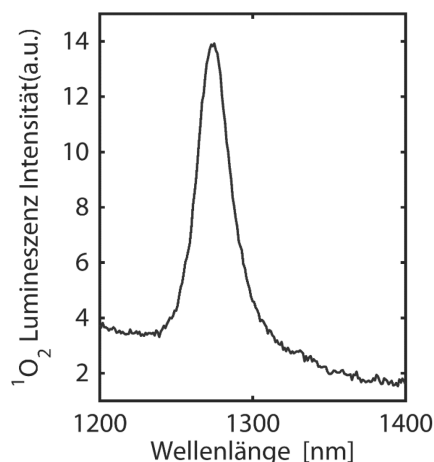


Abbildung 6: Spektrum der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz in Ethanol, generiert durch Phäophorbid a ( $\text{OD}_{666\text{ nm}} = 0,2$ ;  $\lambda_{\text{exc}} = 532\text{ nm}$ )

## 2.2.2 Kinetik in homogenen Systemen

Der zeitliche Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz ist direkt verbunden mit der Kinetik der Generierung und Deaktivierung des  $^1\text{O}_2$ . Die Informationen, die der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik entnommen werden können, variieren stark mit dem Signal-Rausch-Verhältnis der Messung und der Komplexität des untersuchten Systems. Im Folgenden wird vorgestellt, wie in einem einfachen System eine mathematische Beschreibung der Kinetik der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz modelliert werden kann und welche Informationen entnommen werden können.

In einem homogenen System, beispielsweise einem monomeren Photosensibilisator in einem bekannten Lösungsmittel, kann die Kinetik durch eine Raten-gleichung beschrieben werden. Abbildung 7 zeigt einen Ausschnitt aus dem Jablonski Diagramm (siehe Abbildung 4) mit den für die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik relevanten Prozessen. Daraus lässt sich ein Ratengleichungssystem der Form

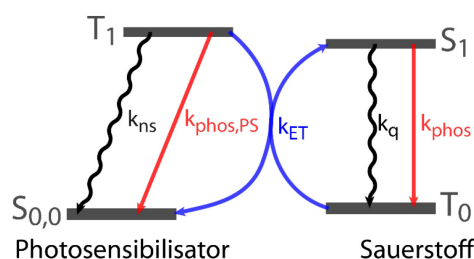


Abbildung 7: Jablonski Diagramm mit allen relevanten Raten für die Herleitung der Kinetik von  $^1\text{O}_2$  in einem homogenen System.

$$\begin{aligned}\frac{d[{}^1\text{O}_2]}{dt} &= +k_{\text{ET}} \cdot [\text{O}_2] \cdot [{}^3\text{PS}^*] - (k_q \cdot [\text{Q}] + k_{\text{phos}}) \cdot [{}^1\text{O}_2] \\ \frac{d[{}^3\text{PS}^*]}{dt} &= - (k_{\text{ET}} \cdot [\text{O}_2] + k_{\text{phos,PS}} + k_{\text{ns}}) \cdot [{}^3\text{PS}^*]\end{aligned}\quad (1)$$

aufstellen. Eine Lösung für die Singulett-Sauerstoff Konzentration  $[{}^1\text{O}_2]$  dieses Ratengleichungssystems ist

$$[{}^1\text{O}_2](t) = [{}^3\text{PS}^*](t=0) \cdot \frac{k_{\text{ET}} \cdot [\text{O}_2]}{k_{\Delta} - k_{\text{T}}} \cdot (e^{-k_{\text{T}}t} - e^{-k_{\Delta}t}) \quad (2)$$

mit  $k_{\Delta} = k_q \cdot [\text{Q}] + k_{\text{phos}}$  und  $k_{\text{T}} = k_{\text{ET}} \cdot [\text{O}_2] + k_{\text{ns}} + k_{\text{phos,PS}}$ .

Dabei ist  $[{}^1\text{O}_2]$  die Konzentration des Singulett-Sauerstoffs,  $[{}^3\text{PS}^*]$  die Konzentration des angeregten Photosensibilisators im Triplett-Zustand,  $[\text{O}_2]$  die Konzentration des molekularen Sauerstoffs und  $[\text{Q}]$  die Konzentration der Quencher.  $k_{\text{ET}}$  ist die Rate des Energietransfers vom angeregten Photosensibilisator an den molekularen Sauerstoff,  $k_q$  die Rate des Quenchings von Singulett-Sauerstoff,  $k_{\text{phos}}$  die Rate der Phosphoreszenz von Singulett-Sauerstoff und  $k_{\text{phos,PS}}$  die Rate der Phosphoreszenz des Photosensibilisators.  $k_{\text{ns}}$  ist eine Rate, die alle nicht strahlenden Desaktivierungskanäle, außer dem Energietransfer, zusammenfasst. Diese besteht neben der Interkombination in den Grundzustand aus verschiedenen Prozessen, die zum Teil andere ROS als Singulett-Sauerstoff generieren.

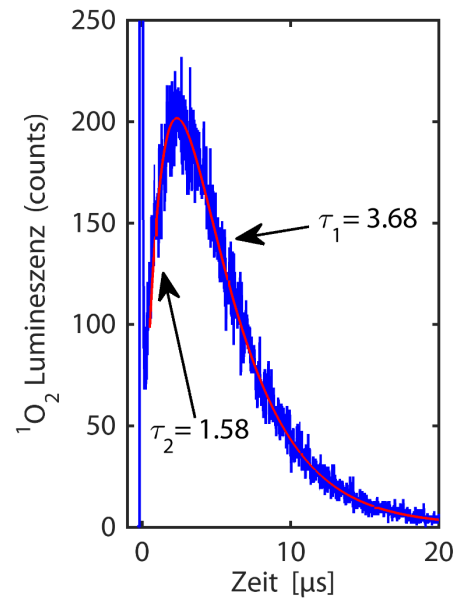


Abbildung 8: Darstellung einer gemessenen  ${}^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik in Wasser, inklusive Fit des Kinetikmodells und ermittelten An- und Abklingzeit.

Für Photosensibilisatoren, die für Typ II Photosensibilisierung optimiert sind, können diese Prozesse oft vernachlässigt werden. Dies muss aber für jedes System, insbesondere für jeden Photosensibilisator separat betrachtet werden. Bekannt ist aber, dass für  $\pi\pi^*$  Triplettübergänge diese Prozesse nahezu vernachlässigbar sind, im Gegensatz zu  $n\pi^*$  Triplettübergängen [58,104,105].

Photosensibilisatoren werden meist so gewählt, dass auch ihre Phosphoreszenz Quantenausbeute möglichst gering ist, deshalb ist die Näherung  $k_T = k_{ET} \cdot [O_2]$  in vielen Fällen zulässig.

Mit dieser Näherung und der Verwendung von Lebensdauern anstelle der Raten ( $\tau=k^{-1}$ ) führt (2) zur viel verwendeten Darstellungsweise:

$$\begin{aligned} [^1O_2](t) &= [^3PS^*] \cdot \frac{\tau_\Delta}{\tau_T - \tau_\Delta} \cdot \left( e^{-t/\tau_T} - e^{-t/\tau_\Delta} \right) \\ &= [^3PS^*] \cdot \frac{\tau_\Delta}{\tau_\Delta - \tau_T} \cdot \left( e^{-t/\tau_\Delta} - e^{-t/\tau_T} \right) \end{aligned} \quad (3)$$

Diese Darstellung der Lösung der Ratengleichung verdeutlicht ein experimentelles Problem bei der Analyse von  $^1O_2$  Lumineszenzkinetik selbst in einem homogenen System: Der Kinetik der  $^1O_2$  Lumineszenz können zwei Zeiten entnommen werden, eine Anklingzeit und eine Abklingzeit. Die Zuordnung dieser Zeiten zur Lebensdauer des Triplett-Zustands des Photosensibilisators und zur Lebensdauer des Singulett-Zustands des Sauerstoffs ist jedoch nicht ohne weiteres möglich.

Abbildung 8 zeigt ein gemessenes  $^1O_2$  Lumineszenz Signal und einen Fit des obigen Kinetikmodells der Form:

$$f(t) = \frac{A}{1 - \tau_2/\tau_1} \cdot \left( e^{-t/\tau_1} - e^{-t/\tau_2} \right) + O \quad (4)$$

Dabei ist A die Amplitude des Signals und O der Offset. Eine Zuordnung der Anklingzeit ( $\tau_2$ ) und der Abklingzeit ( $\tau_1$ ) zu den Lebensdauern ist hier nicht unmittelbar möglich.

Bei einem Photosensibilisator in Lösung ist eine direkte Messung der Lebensdauer des Triplett-Zustands des Photosensibilisators durch Laser-Flash-Photolyse möglich. Daraus würde sich für dieses Beispiel eine Triplett-Lebensdauer von etwa 1,6  $\mu s$  ergeben, sodass  $\tau_T = \tau_2$  und  $\tau_\Delta = \tau_1$  geschlossen werden könnte. In komplexen Systemen oder auf Oberflächen ist eine solche Messung aber nur bedingt möglich. Oftmals ist aber eine indirekte Zuordnung möglich.

Das Quenching ist der dominante Einfluss auf die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer  $\tau_\Delta$ . Deshalb ist sie im Falle eines monomeren Photosensibilisators in Lösung hauptsächlich vom Lösungsmittel abhängig. Damit ist es möglich, durch Vergleichsmessungen verschiedener Photosensibilisatoren in dem gleichen Lösungsmittel einen Erfahrungswert für  $\tau_\Delta$  zu ermitteln. Somit kann in diesem Beispiel geschlossen werden, dass  $\tau_\Delta = \tau_1$  und  $\tau_T = \tau_2$  ist, da 3,7  $\mu s$  eine typische Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Wasser ist [30]. Analog dazu wird im Verlauf dieser Arbeit diese empirische

Zuordnung der An- und Abklingzeit verwendet werden, um mögliche Singulett-Sauerstoff Lebensdauern in verschiedenen Systemen zu ermitteln.

Ein nicht zu unterschätzendes Problem bei der Auswertung von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Daten mit diesem Kinetikmodell ist die mathematische Singularität im Fall  $\tau_T = \tau_\Delta \equiv \tau$ . Bei der Bestimmung von Parametern der Kinetik, wie der Amplitude oder den Lebensdauern, ist es deshalb wichtig, die jeweiligen Konfidenzintervalle zu betrachten. Bei einer numerischen Anpassung einer  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik können diese numerisch abgeschätzt werden. Sie zeigen, dass bei Verwendung dieses Modells (Formel (4)) die Amplituden bei sehr ähnlichen An- und Abklingzeiten nur mit sehr großer Ungenauigkeit bestimmt werden können. Auch die Konfidenzintervalle der bestimmten An- und Abklingzeiten werden trotz gleichem Signal-Rausch-Verhältnis größer wenn die Anklingzeit sehr ähnlich zu der Abklingzeit ist. In einem solchen Fall kann mit Hilfe der Regel von l'Hôpital aus Formel (4) ein passendes Modell der Form

$$f(t) = \frac{A}{\tau} \cdot t \cdot e^{-t/\tau} + O$$

bestimmt werden. [56]

Bei der bisherigen Betrachtung wurde vorausgesetzt, dass die Phosphoreszenz Quantenausbeute des Photosensibilisators vernachlässigbar ist und sowohl der Triplett Zustand des Photosensibilisators als auch der generierte  $^1\text{O}_2$  monoexponentiell deaktiviert werden.

Generell ist die Phosphoreszenz-Quantenausbeute des Photosensibilisators aber nicht vernachlässigbar. Durch den geringen energetischen Abstand zwischen dem Triplett-Zustand des Photosensibilisators und dem Singulett-Zustand des  $\text{O}_2$  kann es zu einem Überlapp des Phosphoreszenz-Spektrums des Photosensibilisators mit dem Emissionsspektrum des Singulett-Sauerstoffs und dem Transmissionsspektrum der Detektionsoptik kommen. Dementsprechend muss die Photosensibilisator Phosphoreszenz in der Betrachtung der Kinetik berücksichtigt werden. In diesem Fall muss das Modell erweitert werden und entspricht dann:

$$f(t) = A_0 \cdot \frac{\tau_\Delta}{\tau_\Delta - \tau_T} \cdot \left( e^{-t/\tau_\Delta} - e^{-t/\tau_T} \right) + A_{\text{phos}} e^{-t/\tau_T} + O \quad (5)$$

Bei der Auswertung einer der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik kommt in diesem Fall also ein weiterer freier Parameter, die Amplitude der Phosphoreszenz des Photosensibilisators  $A_{\text{phos}}$ , hinzu.



## 2.2.3 Diffusion

Wie bereits in Abschnitt 2.1.2 beschrieben wurde, ist sowohl die Generierung als auch die Deaktivierung von  $^1\text{O}_2$  stark diffusionsbasiert. Aus Abschnitt 2.2.2 geht hervor, dass die Diffusion des molekularen Sauerstoffs in der Mikroumgebung des Photosensibilisators der dominante Einfluss auf die Entleerung des Triplett-Zustands des Photosensibilisators ist. Eine effiziente Generierung von  $^1\text{O}_2$  ist nur möglich, wenn in der Mikroumgebung des Photosensibilisators genügend  $\text{O}_2$  vorhanden ist und eine Diffusion des  $\text{O}_2$  in die direkte Umgebung des Photosensibilisators möglich ist. Auch wenn es bei sehr hoher Konzentration des Photosensibilisators zu Quenchingprozessen zwischen Photosensibilisatormolekülen kommen kann, beispielsweise zu Triplett-Triplett-Annihilation [106,107], ist der Einfluss dieser Prozesse meist vernachlässigbar.

Die Deaktivierung des  $^1\text{O}_2$  Moleküls geschieht mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit durch Phosphoreszenz. Der dominante Prozess ist eine Deaktivierung durch ein Quencher-molekül. Dementsprechend sind die Diffusion des  $^1\text{O}_2$  und der Quencher-moleküle, die Effizienz des Quenchings sowie die Quencherkonzentration dominant für die Deaktivierung von  $^1\text{O}_2$  in einem beliebigen System. Um einen Eindruck zu bekommen in welcher Größenordnung die räumliche Verteilung der  $^1\text{O}_2$  Moleküle nach Anregung ist, wird im Folgenden die Diffusion eines  $^1\text{O}_2$  Moleküls in einem einfachen System betrachtet. Für ein homogenes System gilt für ein  $^1\text{O}_2$  Molekül das modifizierte zweite Fick'sche Gesetz der Form:

$$\frac{\partial [^1\text{O}_2](x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 [^1\text{O}_2](x,t)}{\partial x^2} - k_{\Delta} [^1\text{O}_2](x,t)$$

Dabei ist  $[^1\text{O}_2](x,t)$  die orts- und zeitabhängige  $^1\text{O}_2$  Konzentration,  $D$  die Diffusionskonstante und  $k_{\Delta} = k_q \cdot [Q] + k_{\text{phos}}$  die Rate der  $^1\text{O}_2$  Deaktivierung, also das Inverse der messbaren  $^1\text{O}_2$  Lebensdauer. Das klassische zweite Fick'sche Gesetz wird hier um einen Term erweitert, der die Deaktivierung des  $^1\text{O}_2$  berücksichtigt.

Für ein eindimensionales Modell lässt sich folgende Lösung aufstellen:

$$[^1\text{O}_2](\tilde{x}, t) = \frac{1}{2\sqrt{\pi t}} e^{-\frac{\tilde{x}^2}{4t}} e^{-\frac{t}{\tau_{\Delta}}} \quad \text{mit } \tilde{x} = \frac{x}{\sqrt{D}}$$

Die Umskalierung von  $x$  zu  $\tilde{x}$  dient der Verdeutlichung, dass diese Lösung einer zeitlich verbreiterten Gauß'schen Verteilung entspricht. Mit einer Integration über die Zeit lässt sich die räumliche Verteilung der  $^1\text{O}_2$  Molekülen bestimmen. Daraus ergibt sich, dass die Konzentration

innerhalb einer Länge von  $\sqrt{D\tau_{\Delta}}$  um den Faktor  $1/e$  abfällt. In [30] wird diese Rechnung ausführlich erklärt und es wird weiterhin beispielhaft für Zellzytoplasma, Wasser und Deuterium die Länge bestimmt, bei der 95 % des  $^1O_2$  deaktiviert wurde. Es lassen sich Längen von 66 nm für Zellzytoplasma, 258 nm für Wasser und 1113 nm für Deuterium entnehmen. Diese Berechnung zeigt, dass lokal generierter Singulett-Sauerstoff einen sehr individuellen „Wirkradius“ in jedem System hat. Insbesondere bei hoher Quencher Konzentration oder effizientem Quenching beträgt dieser „Wirkradius“ zudem nur wenige Zehn bis wenige Hundert Nanometer.

## 2.2.4 Kinetik in inhomogenen Systemen

Bisher wurden nur homogene Systeme betrachtet. In biologischen Systemen ist eine homogene Lokalisierung der Photosensibilisatoren und eine homogene Mikroumgebung der Photosensibilisatoren allerdings eher als eine Ausnahme zu betrachten. In einem komplexen System ist eher von verschiedenen lokalisierten Photosensibilisatoren und verschiedenen Mikroumgebungen innerhalb des Wirkradius des generierten Singulett-Sauerstoff auszugehen. Demnach ist ein monoexponentieller Ansatz für die Entleerung des Triplett-Zustands des Photosensibilisators und des  $^1O_2$  wie in Formel (3) nur noch eine Näherung.

Durch die Korrelation der Generierung von  $^1O_2$  mit der Kinetik des Photosensibilisator Triplett-Zustands, ist die  $^1O_2$  Lumineszenzkinetik immer eine sequenzielle Kinetik. Die Kinetik des  $^1O_2$  besteht also aus der Kinetik des Triplett-Zustands des Photosensibilisators und der Deaktivierungskinetik des  $^1O_2$ . Zudem werden im Verlauf dieser Arbeit gemessene NIR Signale gezeigt, deren Kinetik einer Superposition aus einer  $^1O_2$  Lumineszenzkinetik, einer Photosensibilisator Phosphoreszenzkinetik und einer unbekannten Kinetik entsprechen. Deshalb wird im Folgenden ein empirischer Ansatz zur Beschreibung komplexer Zerfallskinetik vorgestellt.

Lässt sich eine Zerfallskinetik nicht mehr monoexponentiell beschreiben sind die prominentesten Ansätze die Superposition mehrerer Exponentialfunktionen:

$$I(t) = \sum_i A_i \cdot e^{-k_i t}$$

oder die Annahme einer Verteilungsfunktion  $H(k)$  von monoexponentiell abklingenden Raten:

$$I(t) = A \cdot \int_0^{\infty} H(k) e^{-kt} dk$$

Die Bestimmung der Verteilungsfunktion  $H(k)$  aus experimentellen Daten ist jedoch nur selten möglich, da es immer ein schlecht konditioniertes Problem darstellt [108]. Solange  $H(k)$  einer sehr schmalen Verteilung entspricht, kann sie durch eine Deltafunktion angenähert werden. Ist diese Näherung jedoch nicht möglich, gibt es mehrere Herangehensweisen.

Eine weitverbreitete, rein empirische Funktion zur Beschreibung einer Zerfallskinetik, die einer Verteilungsfunktion unterliegt, ist die Kohlrauschfunktion:

$$I(t) = A \cdot e^{-\left(t/\tau_0\right)^\beta} \quad \text{mit } 0 < \beta \leq 1$$

Bekannt ist diese Funktion beispielsweise zur Beschreibung der Lumineszenzkinetik bei diffusionskontrolliertem Kontaktquenching (mit  $\beta = 0,5$ ) [109]. Sie ist leicht in numerische Anpassungs-Algorithmen zu implementieren und berücksichtigt über den zusätzlichen Parameter  $\beta$  verschiedene Verteilungsfunk-

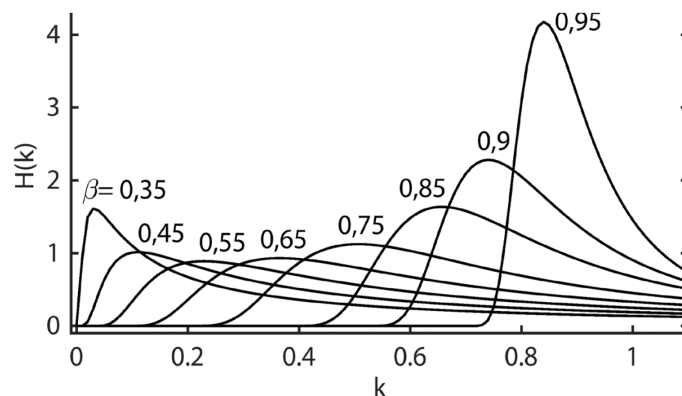


Abbildung 9: Verteilung  $H(k)$  der Ratenkonstanten  $k$  für Kohlrauschfunktionen mit  $\tau_0=1$  und verschiedenen Werten für  $\beta$ . Nach [108].

tionen  $H(k)$ . In Abbildung 9 sind die Verteilungsfunktionen  $H(k)$  für verschiedene Werte  $\beta$  beispielhaft für  $\tau_0=1$  dargestellt. Die Kurven wurden gemäß [108] erstellt. [108–111]

Im Gegensatz zur Superposition von Exponentialfunktionen bietet der Ansatz über eine Kohlrauschfunktion den Vorteil, dass lediglich ein weiterer freier Parameter dem Kinetikmodell hinzugefügt wird.

Bei einer Untersuchung von verschiedenen Chlorin und Phäophorbid Derivaten konnte beispielsweise die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik, die an einigen Chlorin Derivaten in Jurkat Zellen *in vitro* detektiert wurde, nicht über ein einfaches, biexponentielles Modell beschrieben werden. Eine Analyse zeigte, dass die Entleerung des Triplett-Zustands nicht monoexponentiell beschrieben werden kann. Eine Beschreibung über eine Kohlrauschfunktion war hingegen erfolgreich. [112]

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden nahezu ausschließlich Systeme untersucht, bei denen keine homogene Mikroumgebung des Photosensibilisators erwartet werden kann. Deshalb ist es bereits intuitiv sehr wahrscheinlich, dass das oben beschriebene biexponentielle Kinetikmodell nur eine Näherung für die später untersuchten Systeme darstellt.

Aufgrund verschiedener Mikroumgebungen (beispielsweise Agar, Nährmedium und Mikroorganismus) gäbe es bei einer Gleichverteilung des Photosensibilisators bereits ein System mit drei Zonen. Diese Zonen würden sich in lokaler Sauerstoffkonzentration, Diffusionskonstante für Sauerstoff und Photosensibilisator, Quenching-Ratenkonstante und vielen weiteren Eigenschaften unterscheiden.

Eine präzise Kinetikmodellierung wird beliebig kompliziert und Lösungen weisen eine große Anzahl an freien Parametern auf. Selbst bei Signalen mit großem Signal-Rausch-Verhältnis (wie sie beispielsweise aus diversen Fluoreszenzuntersuchungen bekannt sind) kommt es schnell zur Kongruenz der einzelnen Parameter [113]. Bei der Modellfindung zur Beschreibung der komplexen kinetischen Prozesse, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit detektiert werden, geht es also weniger um eine exakte Beschreibung des Systems als um ein Modell, welches mit möglichst wenigen freien Parametern die gemessene Kinetik hinreichend beschreibt.

## **2.2.5 Überlegungen zur Auswertung von Singulett-sauerstoff Lumineszenzmessungen auf Oberflächen**

In den kommenden Abschnitten werden meist Messungen diskutiert, bei denen eine Fläche abgerastert wird und an jedem Punkt eine zeitaufgelöste Messung der NIR Lumineszenz oder eine spektrale Fluoreszenzmessung durchgeführt wird.

Eine Analyse dieser Daten ist mit einigen Herausforderungen verbunden:

- Bei einem Scan wird meist pro Pixel ein Signal mit geringem Signal-Rausch-Verhältnis gemessen, da an einer großen Zahl von Pixeln gemessen werden und die gesamte Messdauer in Grenzen gehalten werden muss.
- Die Struktur der abgerasterten Fläche besteht aus mehreren Regionen, beispielsweise Agar, Filterpapier, mit Mikroorganismus „bewachsenes“ Filterpapier. Diese Struktur muss bei der Analyse beachtet werden.
- Bei vielen Proben ist von einer Schwankung der Mikroumgebung zwischen den jeweils vermessenen Probenvolumina auszugehen, sodass Pixel einer Region untereinander nur in bedingt Maße vergleichbar sind.

### **Fluoreszenz und VIS Lumineszenz**

Die auf der Probenoberfläche gemessene Fluoreszenz kann Aufschluss über die Verteilung und Aktivität des Photosensibilisators geben. Auch eventuelle Fluoreszenz aus anderen Quellen,

beispielsweise der Lichtsammelkomplexe von phototrophen Organismen, können detektiert und quantifiziert werden.

Bei der Analyse von Fluoreszenzmessungen spielt bei den meisten Fragestellungen die Intensitätsverteilung auf der Probenfläche eine große Rolle. Für eine Analyse der Fluoreszenzintensität ist eine Untergrundkorrektur obligatorisch. Unter der Voraussetzung, dass es keine Störlumineszenz und keine Änderung des Fluoreszenzspektrums gibt, kann nach der Untergrundkorrektur die Gesamtintensität als Integral über das gemessene Spektrum errechnet und als Intensitätsplot dargestellt werden. In Anwesenheit von Störlumineszenz ist die Trennung von Photosensibilisator Fluoreszenz und Störlumineszenz wichtig. Dies gelingt allerdings auf einfache Art und Weise nur, wenn beide Lumineszenzen spektral eindeutig trennbar sind.

### **Singulett-Sauerstoff- und NIR Lumineszenz**

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird in der Betrachtung der detektierten NIR Lumineszenz zwischen  $^1\text{O}_2$ - und NIR Lumineszenzkinetik unterschieden. Allgemein wird jede Lumineszenz gemessen, die die optische Diskriminierung transmittieren kann und im spektralen Empfindlichkeitsbereich des verwendeten Detektors liegt. Da im Mittelpunkt dieser Arbeit der zeitaufgelöste Nachweis von  $^1\text{O}_2$  steht, ist ein weiteres Kriterium für die zeitaufgelöste Detektion einer NIR Lumineszenz, dass die Lumineszenzkinetik innerhalb des Messfensters, aber oberhalb des Auflösungsvermögens des Detektionssystems liegt. Die NIR Kinetik muss also in einem der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik ähnlichen Zeitbereich liegen.

Im Verlauf dieser Arbeit werden oftmals NIR Lumineszenzsignale gezeigt, bei denen die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik mit einer NIR Lumineszenz aus anderen, unbekannten Quellen überlagert wird. Diese NIR Lumineszenz aus unbekannten Quellen werden im Folgenden als „Störsignal“ bezeichnet. Die Überlagerung einer  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik mit einem Störsignal wird im Folgenden deshalb NIR Lumineszenzkinetik bezeichnet.

Eine Analyse der Kinetik erfolgt durch Anpassung eines entsprechenden Kinetikmodells an die detektierte zeitaufgelöste Lumineszenz eines jeden Pixels. Ziele der Auswertung sind zunächst für jedes Experiment individuell, in dieser Arbeit stehen jedoch zwei Punkte im Vordergrund:

- Eine Visualisierung der lateralen Verteilungen der ermittelten kinetischen Parameter.
- Die Bestimmung der Mittelwerte der  $^1\text{O}_2$  Amplitude und der An- und Abklingzeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Kinetik einer Probe um zusammenfassende Aussagen über die Probe zu erhalten.

## 2.3 Photodynamischen Inaktivierung von Mikroorganismen

Wie bereits in der Einleitung angeführt wurde, ist die Notwendigkeit zur Suche nach neuen Methoden der Bekämpfung von Mikroorganismen durch steigende Resistenzbildung gegeben. Die Photodynamische Inaktivierung (PDI) von Mikroorganismen ist eine sehr vielversprechende Alternative, bei der die Gefahr einer Resistenzbildung der Mikroorganismen im Vergleich zu Antibiotika äußerst gering ist. Zudem können durch die PDI nicht nur verschiedene Bakterien, sondern auch Pilze und phototrophe Organismen, wie beispielsweise Algen, inhibiert und inaktiviert werden. Im Folgenden werden mögliche molekulare Wirkmechanismen, mögliche Resistenzmechanismen sowie Anforderungen an Photosensibilisatoren diskutiert. Dabei konzentriert sich die Diskussion zunächst auf Bakterien, bevor auf die PDI von Pilzen und phototrophen Organismen eingegangen wird.

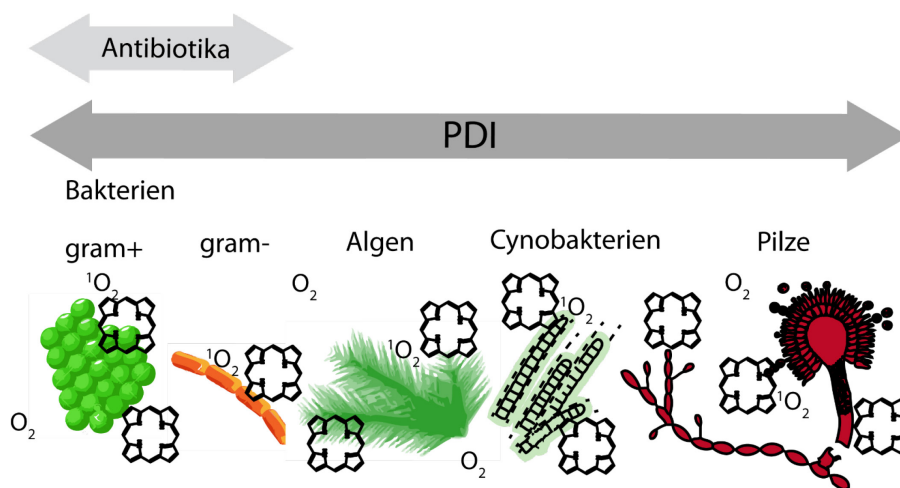


Abbildung 10: Mögliche Anwendungsgebiete der PDI. Im Gegensatz zu Antibiotika, die nur gegen Bakterien wirken, kann die PDI auch gegen phototrophe Organismen wie Algen oder Cyanobakterien und Pilze eingesetzt werden. Übersetzt aus [30].

### Photodynamische Inaktivierung von Bakterien

Mikroorganismen haben alle eine Gemeinsamkeit, die sie von menschlichen und tierischen Zellen unterscheidet: die Zellwand. Während menschliche und tierische Zellen lediglich von einer Zellmembran umgeben sind, werden die Zellen von Mikroorganismen durch eine zusätzliche Zellwand geschützt. Diese besteht aus Polysacchariden, je nach Mikroorganismus aus Chitin (bei Pilzen), Cellulose (bei Algen) oder Murein (bei Bakterien). Bei Bakterien wird, je nach Aufbau der Zellwand, zwischen grampositiven (gram<sup>+</sup>) und gramnegativen (gram<sup>-</sup>) Bakterien unterschieden.

Abbildung 11 zeigt schematisch die unterschiedlich aufgebauten Zellwände. Besonders große Unterschiede zwischen  $\text{gram}^+$  und  $\text{gram}^-$  Bakterien zeigen sich in der Permeabilität der Membran. Die Zellwand von  $\text{gram}^+$  Bakterien ist relativ permeabel. Moleküle bis zu einer Masse von 30 bis 60 Kilodalton können in die innere Plasmamembran diffundieren [114]. Photosensibilisatoren haben eine Masse, die selten wenige Kilodalton überschreitet. Deshalb fungiert die Zellwand  $\text{gram}^+$  Bakterien kaum als Barriere für die meisten in der PDI verwendeten Photosensibilisatoren.

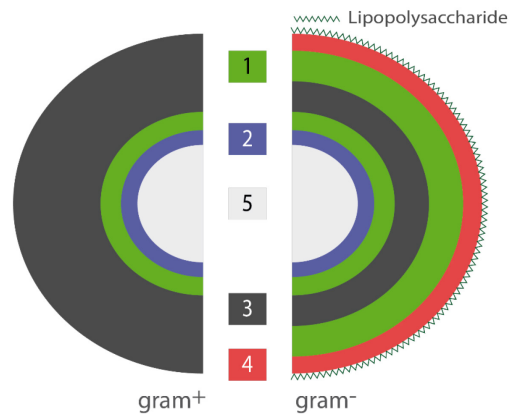


Abbildung 11: Schematischer Aufbau der Zellwand von  $\text{gram}^+$  und  $\text{gram}^-$  Bakterien. 1: periplastischer Raum, 2: Plasmamembran, 3: Murein, 4: äußere Membran mit aufgelagerten Lipopolysacchariden, 5: Cytoplasma. Adaptiert aus [55].

Die Permeabilität der Zellwand  $\text{gram}^-$  Bakterien ist im Gegensatz dazu durch ihren komplexeren Aufbau deutlich geringer. Hydrophile Moleküle unter 700 Dalton können durch Porinkanäle hindurch diffundieren [115], größere Moleküle, wie die meisten Photosensibilisatoren, jedoch nicht.

Die Zellwand bietet dem Mikroorganismus Struktur und Schutz und ist deshalb lebensnotwendig für die Zelle. Dementsprechend bietet sie sich als Angriffspunkt aller Mikroorganismen bei ihrer Inaktivierung an.

Viele Antibiotika, per Definition alle Bakteriolytika, wirken durch die Auflösung der Zellwand oder die Hemmung der Zellwandsynthese. Antibiotika allgemein wirken durch spezifische Reaktionen mit Molekülen der Zellwand, des Cytoplasmas oder der DNS. Antibiotika greifen also verschiedene, aber immer spezifische Ziele im Bakterium an, sie wirken gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der PDI zu plötzlichem, massiven oxidativen Stress. Dieser wird ausgelöst sobald Photosensibilisatoren durch Licht angeregt werden und es damit zur Photosensibilisierung kommt. Die generierten ROS führen durch eine Vielzahl von Oxidationsreaktionen zu einer Perforation der Zellwand der Bakterien und damit zum Zelltod. Bei Lokalisierung des Photosensibilisators innerhalb der Zelle kann aber auch durch die oxidative Schädigung anderer Zellbestandteile der Zelltod herbeigeführt werden, beispielsweise durch

Schädigung der DNS [116]. Bei der PDI gibt es also keine spezifischen Ziele, sondern es kommt zu einer unspezifischen, oxidativen Schädigung der Zelle. [11,27,116–118]

Dabei wurde lange davon ausgegangen, dass der Photosensibilisator in der inneren Plasmamembran oder anderen spezifischen Stellen der Zelle lokalisiert sein muss um die Zellwand effizient schädigen zu können [118]. 2013 zeigten Preuß et al. allerdings, dass selbst gram<sup>+</sup> Bakterien auch ohne Eindringen des Photosensibilisators in die Zelle Photodynamisch Inaktiviert werden können [119]. Es ist also keine spezifische Lokalisierung des Photosensibilisators innerhalb oder außerhalb der Zelle erforderlich. [11,118–120]

Verschiedene Mikroorganismen sind von Natur aus mit ROS konfrontiert: Bei phototrophen Organismen entstehen beispielsweise verschiedene ROS als Nebenprodukt der Photosynthese [121]. Pathogene Bakterien werden mit ROS konfrontiert, die intrazellulär von Phagozythen generiert werden als Teil der menschlichen Immunantwort [11].

Dementsprechend müssen einige Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung oxidativen Stress bewältigen. Durch verschiedene enzymatische Proteinen, wie Peroxidase oder Katalase, werden spezifische ROS abgebaut. Die beiden beispielhaft genannten Enzyme bilden die wichtigsten Quencher für Wasserstoffperoxid in Bakterien. Wird von einer Zelle oxidativer Stress wahrgenommen, kommt es durch Genexpression zu einer überhöhten Biosynthese der Quencherenzyme.

Auch wenn eine Resistenzbildung von Bakterien analog zu der gegen Antibiotika ausgeschlossen ist, da die PDI nicht gemäß dem Schlüssel-Schloss-Prinzip wirkt, könnte also eine Resistenzbildung durch Adaption an den oxidativen Stress stattfinden. Warum die Resistenzbildung gegen die PDI trotzdem noch immer als unwahrscheinlich angesehen wird hat folgende Gründe: Sobald Photosensibilisatoren am oder im Bakterium lokalisiert sind und sie durch Licht angeregt werden kommt es zu einer plötzlichen und massiven Generierung von ROS, sodass eine toxische Wirkung einsetzt, bevor die Zelle durch Überexpression Quencherproteine synthetisieren kann. Es bleibt also keine Zeit für eine adäquate Reaktion. Wenn der Photosensibilisator außerhalb der Zelle lokalisiert ist, kommt es durch die geringe Diffusionsreichweite der ROS zu einer starken Schädigung der Zellwand, noch bevor die Zelle den oxidativen Stress registrieren kann. Vor allem aber gibt es keinen enzymatischen Schutz gegen Singulett-Sauerstoff. Auch jenseits enzymatischer Schutzmechanismen ist ein Abwehrmechanismus von pathogenen Bakterien gegen Singulett-Sauerstoff nicht bekannt. [11,120]

Phototrophe Organismen werden von Natur aus mit oxidativem Stress durch Singulett-Sauerstoff konfrontiert, der als Nebenprodukt in der Photosynthese entstehen. Dementsprechend haben



phototrophe Organismen Abwehrmechanismen gegen Singulett-Sauerstoff entwickelt. Ein prominentes Beispiel dafür sind Karotinoide, die zum einen Singulett-Sauerstoff und zum anderen den Triplett Zustand von Chlorophyll quenchen. Allerdings würde auch eine überhöhte Synthese von Singulett-Sauerstoff Quenchern nicht gegen oxidative Schäden der Zellwand helfen, die durch Photosensibilisatoren außerhalb der Zelle hervorgerufen werden, da diese Schäden erst registriert würden, wenn bereits toxische oxidative Schäden verursacht wurden. [11]

Eine Lokalisation der Photosensibilisatoren an oder in der mikroskopischen Nähe der Zellwand, aber außerhalb der Zelle, bringt nicht nur Vorteile in Bezug auf mögliche Abwehrmechanismen mit sich. In Hinsicht auf die Anwendung von photodynamisch funktionalisierten Oberflächen wäre ein Eindringen der Photosensibilisatoren in die Zelle mit einem „Verbrauch“ der Photosensibilisatoren von der funktionalisierten Oberfläche verbunden. Eine oxidative Schädigung der Zellwand von außen könnte im Gegensatz dazu durch Photosensibilisatoren hervorgerufen werden, die direkt, oder über lange Linker, durch kovalente Bindungen auf der Oberfläche verankert wären. Damit wäre die funktionalisierte Oberfläche deutlich länger photodynamisch aktiv.

## **Pilze**

Neben bakteriellen Infektionen geht auch von Mykosen, also durch Pilze verursachte Infektionskrankheiten, eine große Gefahr aus. Einige Hefepilze, Schimmelpilze und alle Dermatophyten gelten als Erreger von Mykosen. Der Lebenszyklus von Pilzen beinhaltet die Ausbreitung durch enorm widerstandsfähige Sporen und das Wachstum in netzwerkartigen Hyphen. Dadurch sind Pilze widerstandsfähiger als Bakterien, wodurch Mykosen nur sehr schwer zu behandeln sind. [30,122]

Die Zellwand von Pilzen ist noch komplexer als die von gramnegativen Bakterien. Die Permeabilität des Hefepilzes *Candida* liegt zwischen der von gram<sup>+</sup> und gram<sup>-</sup> Bakterien [30,123]. Die Photodynamische Inaktivierung von *Candida*, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, wurde bereits mehrfach und mit verschiedenen Photosensibilisatoren berichtet [30]. Allerdings zeigte sich in allen Studien, dass höhere Dosen notwendig sind als bei der PDI von Bakterien. Zudem konnte bisher keine vollständige Inaktivierung erreicht werden. Einige Zeit nach der PDI wurde wieder Pilzwachstum beobachtet. [30,124–127]

Auch wenn Schimmelpilze bisher deutlich weniger untersucht wurden als Hefepilze ist die medizinische Relevanz der PDI von Schimmelpilzen genauso hoch wie die von Hefepilzen. Die gesundheitsgefährdende Wirkung von Schimmelpilzen ist allgemein bekannt. Durch den komplexen Lebenszyklus und die Vermehrung durch äußerst resistente Sporen ist die PDI von Schimmelpilzen deutlich schwieriger als die von Bakterien. Preuß et al. gelang es 2014 mit Hilfe

eines kationischen Corrols Schimmelpilze nicht nur zu inhibieren, sondern zu inaktivieren. Es konnten also sogar die Sporen erfolgreich Photodynamisch Inaktiviert werden. [128]

Dermatophyten sind Pilze, die eine spezifische Mykose der Haut auslösen. Es gibt bereits mehrere *in vivo* Studien zur photodynamischen Behandlung verschiedener Dermatophytosen, jedoch konnte bisher nur eine Inhibierung der Dermatophyten erreicht werden. Großes Potential wird trotzdem gesehen, da bisher nur wenige, klinisch zugelassene Photosensibilisatoren für die Studien verwendet wurden. Kandidaten für eine erfolgreiche Inaktivierung gibt es mehrere, jedoch fehlen bisher die präklinischen Toxizitätstests. [129]

### **Phototrophe Organismen**

Biofilme, insbesondere phototrophe Biofilme, sind die Hauptursache für den biologischen Verfall von Baustoffen. Die Folgen davon sind der Verfall von Kulturgütern oder aber alltägliche Gefahren für Menschen durch marode Bauwerke. Da die etablierten Verfahren zur Bekämpfung große Nachteile mit sich bringen ist auch hier die Suche nach Alternativen von großem Interesse. Chemische Verfahren zur Bekämpfung phototropher Biofilme führen zur Belastung der Umwelt durch Biozide und mechanische Verfahren führen zu starker Erosion, die das Wachstum neuer Biofilme erleichtert. Die Inhibierung von Biofilmen ist derzeit das größte Anwendungsgebiet von Titandioxid-funktionalisierten Oberflächen [43,130,131]. Dieser photokatalytische Ansatz wurde bereits in der Einleitung diskutiert. Auch wenn die Verwendung von Titandioxid gegen phototrophe Biofilme mehrere andere Nachteile mit sich bringt [37,132,133], ist die Gefahr einer karzinogenen Wirkung von Titandioxid ein schlagendes Argument für die Suche nach Alternativen [44,45].

Allerdings zeigte sich die PDI von phototrophen Organismen bisher als besonders schwierig. Seit 2003 gab es mehrere Versuche einer erfolgreichen PDI von phototrophen Biofilmen, Grünalgen und Cyanobakterien, diese zeigten aber lediglich eine Verlangsamung des Wachstums und keine vollständige Inaktivierung. Dadurch, dass verschiedene ROS als Nebenprodukt der Photosynthese generiert werden, haben phototrophe Organismen von Natur aus Mechanismen, die ROS, inklusive Singulett-Sauerstoff, in gewissem Maße quenchen. [30,36,37,133]

Die bisher erste und einzige erfolgreiche Inaktivierung von Grünalgen durch Typ II Photosensibilisierung gelang Pohl et al. im Jahr 2015 [36]. In dieser Studie konnten mehrere Algenstämme erfolgreich durch ein kationisches Phosphor-Corrol inaktiviert werden. Die Untersuchungen wurden in Suspension mit naturähnlichem Tag-Nacht-Rhythmus durchgeführt. Über einen Zeitraum von 18 Tagen konnte eine deutliche Abnahme der Biomasse beobachtet werden.

Der Übergang von Suspensionsuntersuchungen hin zu Untersuchungen auf Oberflächen ist ein wichtiger nächster Schritt auf dem Weg zur PDI von phototrophen Biofilmen. Aus diesem Grund wird in Abschnitt 4.3 die Untersuchung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz während der PDI von Grünalgen auf Nährböden vorgestellt.

### **Zusammenfassung**

Bisher konnte von der erfolgreichen photodynamischen Inaktivierung verschiedener Mikroorganismen berichtet werden. In Hinblick auf mögliche Resistenzmechanismen und Anwendungen ist eine photodynamische Wirkung durch angeregte Photosensibilisatoren, die außerhalb der Zelle lokalisiert sind, deutlich zu bevorzugen.

Aus den bisherigen Studien ist bekannt, dass die PDI in Suspension deutlich leichter zu realisieren ist als auf Nährböden. Da aber viele Zielorganismen in ihrer natürlichen Umgebung flächig wachsen, ist der Schritt von Suspensionsuntersuchungen zu Experimenten auf Nährböden ein wichtiger nächster Schritt. Neben der Etablierung von verschiedenen Kultivierungsprotokollen und vor allem der Erforschung von Viabilitätstests auf Oberflächen, ist die Entwicklung spektroskopischer Methoden für die Erforschung der PDI auf Oberflächen notwendig.

### **2.3.1 Photosensibilisatoren in der PDI**

Aufgrund der negativen Ladung der Zellwände von Mikroorganismen zeigen vor allem kationische Photosensibilisatoren Wirkung gegen Mikroorganismen. Neben den beiden im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren wurden verschiedene kationische Tetrapyrrole bereits erfolgreich gegen Mikroorganismen eingesetzt. Aber auch kationische Phenothiazin-Derivate wie Methylenblau oder Toluidinblau wurden erfolgreich gegen gram<sup>+</sup> Bakterien getestet. Durch die medizinische Zulassung der beiden Phenothiazin-Derivate werden sie bereits in der Zahnmedizin eingesetzt. Bei der PDI von Parodontose wird beispielsweise Methylenblau als Photosensibilisator verwendet [29]. Unter den erfolgreich gegen Mikroorganismen eingesetzten Photosensibilisatoren sind aber auch einige neutrale Tetrapyrrole, wie Zink-Phtalocyanin. Eine besondere Rolle spielen die beiden in dieser Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren, da sie in der Lage sind, beinahe alle der bisher hier diskutierten Mikroorganismen zu inhibieren oder sogar zu inaktivieren.

### **Allgemeine Anforderungen an Photosensibilisatoren**

Die allgemeinen Anforderungen an einen Photosensibilisator sind, unabhängig vom Anwendungsgebiet, zunächst Folgende:

- Hohe Interkombinations-Quantenausbeute und hohe Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute
- Hohe Extinktion im sichtbaren Spektralbereich des Lichts
- Photostabilität und chemische Stabilität
- Keine Dunkeltoxizität

Außerdem gibt es den Anspruch, dass der Syntheseaufwand ökologisch und ökonomisch sinnvoll sein muss.

Es hat sich gezeigt, dass die Gruppe der Tetrapyrrole besonders gut als Photosensibilisatoren geeignet sind. Sie verfügen über ein großes, zyklisches und konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem. Dieses verursacht eine hohe Extinktion im sichtbaren Spektralbereich des Lichts, sowie eine starke Spin-Bahn-Kopplung, was wiederum eine hohe Interkombinations-Quantenausbeute bedingt.

### Verwendete Photosensibilisatoren

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Photosensibilisatoren an verschiedenen Mikroorganismen verwendet: kationisches 5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)-porphyrin tetra(p-toluenesulfonate) (**TMPyP**) und 5,10,15-tris-(1-methylpyridinium-2-yl)corrolato-(trans-dihydroxo)phosphorus(V) (**PCor<sup>+</sup>**). Die Strukturformeln beider Photosensibilisatoren sind in Abbildung 12 gezeigt.

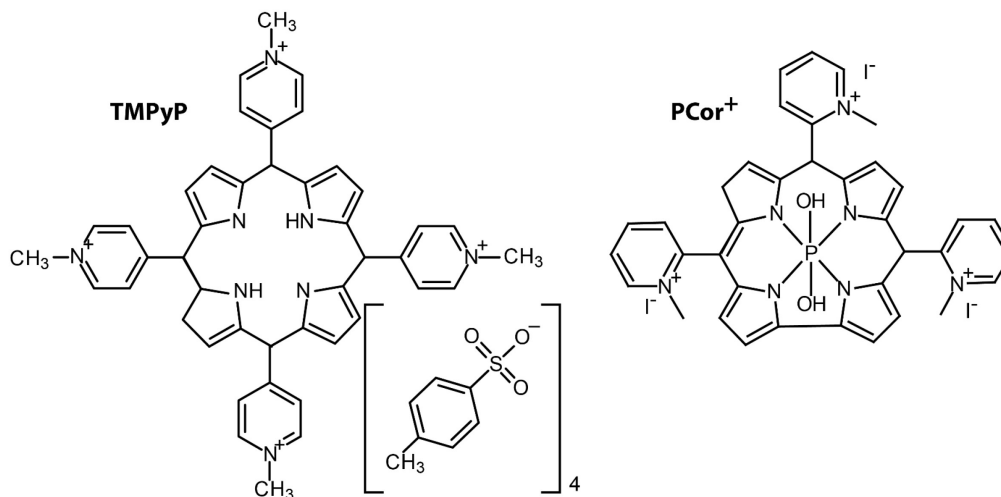


Abbildung 12: Strukturformeln von TMPyP und PCor<sup>+</sup>. Beide Moleküle sind kationisch und eignen sich sehr gut als Photosensibilisatoren für die PDI.

Beide Photosensibilisatoren sind mehrfach positiv geladen und wurden erfolgreich zur PDI von Mikroorganismen eingesetzt. TMPyP ist ein kommerziell erhältlicher Photosensibilisator<sup>1</sup> der in der PDI bereits erfolgreich gegen gram<sup>+</sup> und gram<sup>-</sup> Bakterien [119], Cyanobakterien und Hefepilze [134] eingesetzt wurde. Zudem zeigte er eine deutlich hemmende Wirkung an Biofilm-bildenden Mikroorganismen [135].

PCor<sup>+</sup> wurde in der Arbeitsgruppe von Zeev Gross am *Israel Institute of Technology* erstmalig im Jahr 2013 synthetisiert und zeigt sehr gute Eigenschaften als Photosensibilisator in der PDI. Er wurde bereits erfolgreich gegen Bakterien [30], Algen [36] und Pilze, sogar gegen Pilzsporen [128] eingesetzt. PCor<sup>+</sup> ist also ein Photosensibilisator, der schon erfolgreich gegen alle in dieser Arbeit diskutierten Mikroorganismen eingesetzt werden konnte.

Die für ihre Funktion als Photosensibilisator wichtigen photophysikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 für wässrige Lösungen aufgeführt. Beide Photosensibilisatoren zeigen hohe <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Quantenausbeuten. Die angegebenen Lebensdauern des Photosensibilisator Triplett-Zustands und des <sup>1</sup>O<sub>2</sub> wurden aus einer zeitaufgelösten Messung der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz ermittelt, die mit dem in Abschnitt 3 vorgestellten Messplatz in einer jeweils 3 µM wässrigen Lösung für 10 s durchgeführt wurde. Die <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzsignale und Fits der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik sind in Abbildung 15 dargestellt. Die anderen Werte wurden den angegebenen Referenzen entnommen. Beide Photosensibilisatoren zeigen hohe Photostabilität und bisherige Untersuchungen zeigen keine Hinweise auf chemische Instabilität.

*Tabelle 1: Übersicht der photophysikalischen Eigenschaften von TMPyP und PCor<sup>+</sup> in H<sub>2</sub>O.*

	<b>TMPYP</b>	<b>PCor<sup>+</sup></b>
Fluoreszenzquantenausbeute	$\Phi_{FL} = 4,7\% [136]$	$\Phi_{FL} = (16,5 \pm 0,3)\% [128,137]$
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> Quantenausbeute in H <sub>2</sub> O	$\Phi_{\Delta} = (72 \pm 4)\% [138]$	$\Phi_{\Delta} = (81 \pm 7)\% [128]$
Triplett Lebensdauer in H <sub>2</sub> O	$\tau_T = (1,63 \pm 0,02) \mu s$	$\tau_T = (2,56 \pm 0,06) \mu s$
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> Lebensdauer in H <sub>2</sub> O	$\tau_{\Delta} = (3,58 \pm 0,02) \mu s$	$\tau_{\Delta} = (3,69 \pm 0,07) \mu s$

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von TMPyP und PCor<sup>+</sup> sind in Abbildung 14 und Abbildung 13 dargestellt. Beide Photosensibilisatoren zeigen eine deutliche Absorption im sichtbaren Spektralbereich, mit einer ausgeprägten Soret-Bande im Bereich von 410 nm bis 420 nm und vier dominante Banden zwischen 500 nm und 700 nm. Das Fluoreszenzspektrum von TMPyP zeigt eine dominante Bande bei 660 nm und eine schwache Bande bei 720 nm. Das Verhältnis der

---

<sup>1</sup> CAS 36951-72-1

beiden Fluoreszenzbanden ist stark vom Lösungsmittel beziehungsweise der Mikroumgebung abhängig, deshalb unterscheidet es sich auch von den später gezeigten Fluoreszenzspektren von TMPyP, die auf verschiedenen Oberflächen gemessen wurden. Da die Eigenschaften der Fluoreszenz von TMPyP in H<sub>2</sub>O sehr komplex sind, ist an dieser Stelle nur auf die entsprechende Literatur ([136,139–141]) zu verweisen. Das Fluoreszenzspektrum von PCor<sup>+</sup> in H<sub>2</sub>O zeigt eine dominante Bande bei 600 nm und eine schwache Bande bei 645 nm.

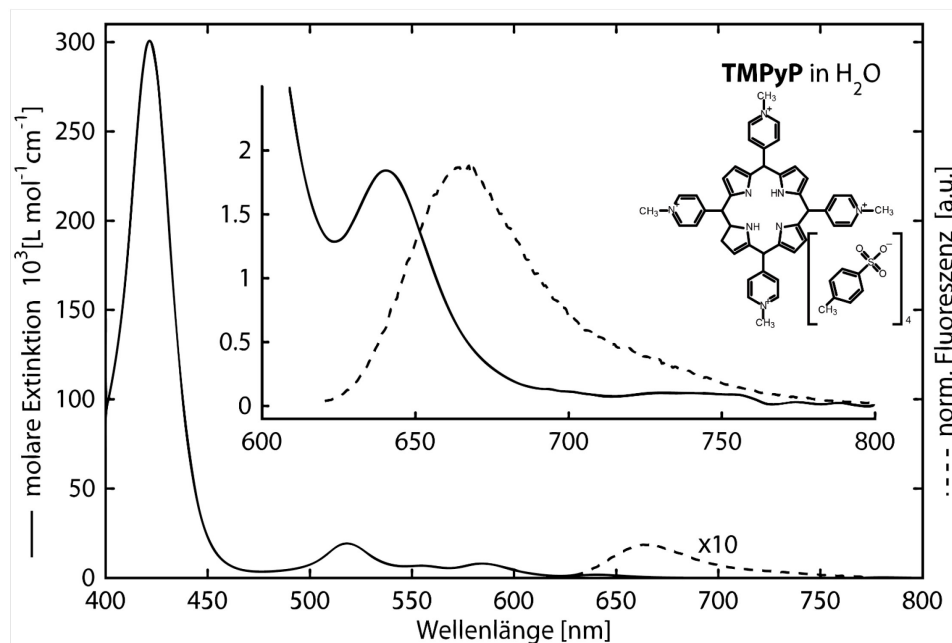


Abbildung 14: Extinktions- und Fluoreszenzspektrum von TMPyP in  $\text{H}_2\text{O}$ . Neben der Soretbande bei 423 nm sind vier Banden zwischen 500 und 650 nm zu erkennen. Das Fluoreszenzspektrum zeigt eine dominante Bande bei 660 nm und eine schwache Bande bei 720 nm. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenzbanden ist stark vom Lösungsmittel beziehungsweise der Mikroumgebung abhängig [136].

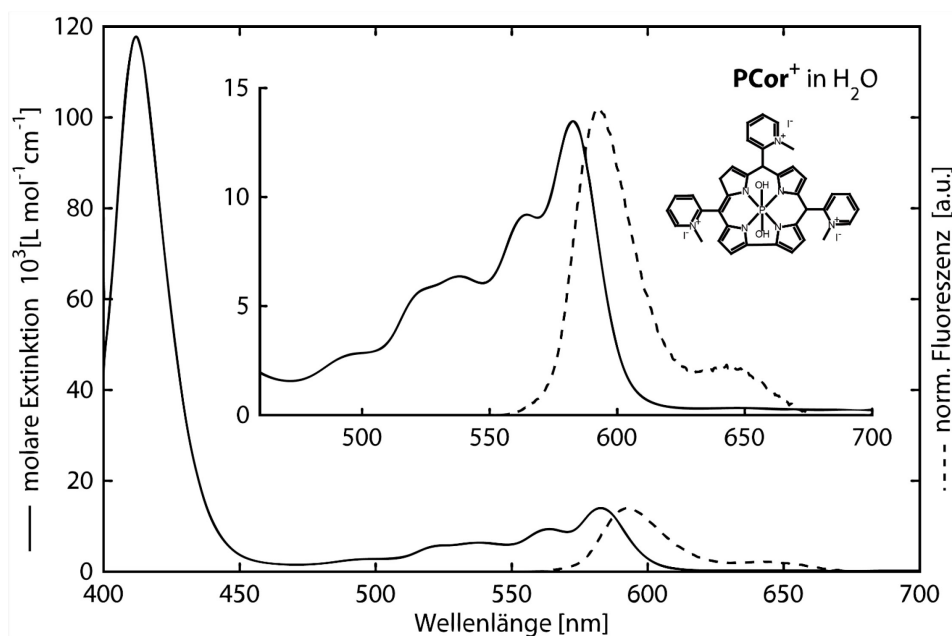


Abbildung 13: Extinktions- und Fluoreszenzspektrum von PCor<sup>+</sup> in  $\text{H}_2\text{O}$ . Neben der Soretbande bei 413 nm sind vier Banden zwischen 470 und 600 nm zu erkennen. Das Fluoreszenzspektrum zeigt eine dominante Bande bei 600 nm und eine schwache Bande bei 645 nm.

Bei der Betrachtung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik in Abbildung 15 ist zu beachten, dass die gezeigten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzsignale nicht absorptionskorrigiert sind. Das Verhältnis der Amplituden ist demnach nicht proportional zum Verhältnis der  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeuten. Die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik beider Photosensibilisatoren weist eine für  $\text{H}_2\text{O}$  typische  $^1\text{O}_2$ -Lebensdauer von etwa  $3,6\ \mu\text{s}$  auf.

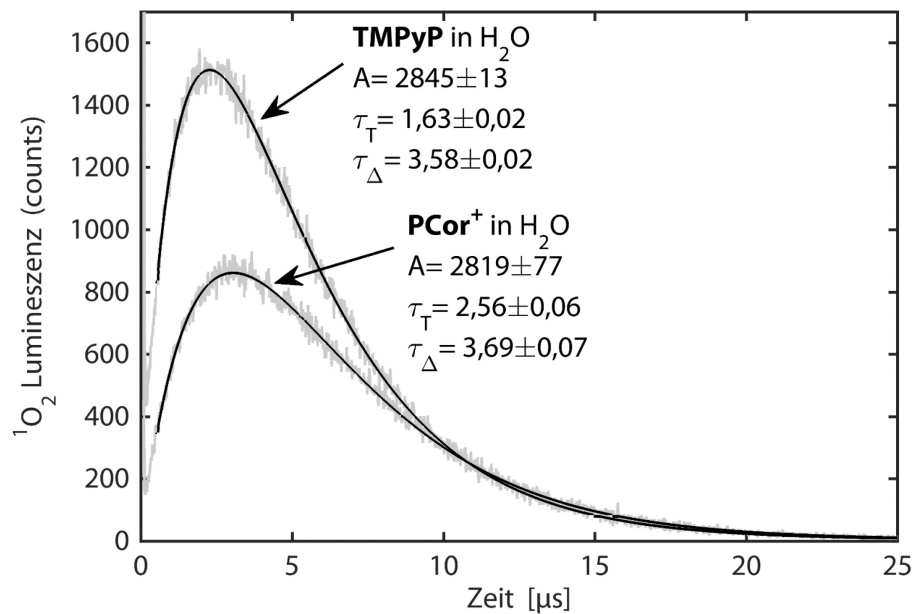


Abbildung 15:  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik von TMPyP und PCor $^+$  in  $\text{H}_2\text{O}$  (jeweils  $3\ \mu\text{M}$ ). Anregung mit  $0,3\ \mu\text{J}$  bei  $405\ \text{nm}$ .



## **3 Zeitaufgelöste Detektion von Singulett-Sauerstoff auf Oberflächen**

### **3.1 Entwicklung eines Messplatzes zur zeitaufgelösten Detektion der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz auf Oberflächen**

#### **3.1.1 Anforderungen und Konzept**

##### **Anforderungen**

Die Detektion eines sehr geringen Lumineszenz Signals auf Oberflächen empfindlicher mikrobiologischer Systeme bedingt einige besondere Anforderungen an einen Messplatz:

1. Die Detektion der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz muss mit maximaler Effizienz erfolgen.
  - Die Detektionsoptik sollte das Licht aus einem möglichst großen Raumwinkel sammeln.
  - Der Detektor und die Elektronik müssen das Licht möglichst rauscharm und effizient detektieren.
2. Ein Anregungslaser sollte die Probe definiert und mit ausreichend hoher Intensität anregen. Die Wellenlänge sollte ein möglichst breites Spektrum möglicher Photosensibilisatoren anregen können.
3. Die zu scannende Fläche muss groß genug sein um mikrobiologische Standardprobenbehälter, wie Petrischalen oder Mikrotiterplatten, abrastern zu können.
4. Die räumliche Auflösung sollte im 0,1 mm Bereich liegen, um auch Strukturen im Millimeterbereich, wie kleine Bakterienkolonien, auflösen zu können. Auf Grund der sehr geringen Lumineszenzintensität ist aber eine geringere räumliche Auflösung wenig erstrebenswert.
5. Die Messung an versiegelten Proben muss möglich sein um eine Kontamination der Probe während der Messung auszuschließen. Auch die Kontamination der Umgebung durch sporenbildende Proben ist eine potentielle Gefahr.

6. Da der Messplatz in einem Mikrobiologielabor eingesetzt werden soll, muss der Messplatz möglichst kompakt und mobil sein, jedoch so stabil, dass mechanische Einflüsse bei Messungen über mehrere Stunden ausgeschlossen werden können.
7. Da Änderungen der Proben über Tage hinweg beobachtet werden, muss eine qualitativ und quantitative Reproduzierbarkeit gegeben sein. Biologische Proben müssen zwischen Messungen in den meisten Fällen in Inkubatoren gelagert werden, deshalb ist eine reproduzierbare Einspannmöglichkeit für Proben notwendig.
8. Aufgrund der in Kapitel 1.4 diskutierten Zielsetzung soll die Photosensibilisator Fluoreszenz parallel detektiert werden.

## Konzept

Bevor im folgenden Abschnitt die technische Realisierung im Detail vorgestellt wird, sollen hier der Übersicht halber das Konzept zur Lösung der oben angerissenen Probleme aufgeführt werden:

1. Die Detektion der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz erfolgt über ein im Zuge eines EXIST-Projekts entwickeltes Singulett-Sauerstoff Lumineszenz Detektionssystem mit sehr hoher Effizienz.
2. Die Anregung der Probe geschieht über einen modulierten 405 nm Diodenlaser. Da die meisten Photosensibilisatoren zur Familie der Tetrapyrrole gehören und damit eine stark absorbierende Soret-Bande zwischen 380 nm und 440 nm aufweisen, ist diese Wellenlänge gut geeignet.  
Das Konzept der Anregungs- und Detektionsoptik sieht „schräge“ Anregung in einem Winkel von etwa 40° und eine senkrechte Detektion vor. Die Lumineszenz wird durch ein Linsensystem möglichst effizient in eine Lichtwellenleitfaser (im Folgenden Detektionsfaser genannt) eingekoppelt.
3. Eine Scanfläche von 25 x 25 cm ist ausreichend groß um alle gängigen mikrobiologischen Probenbehälter abzurastern.
4. Je nach Detektionsfaser liegt die laterale Auflösung bei 100 oder 300 µm.
5. Die Detektionsoptik wurde so konstruiert, dass der Abstand zwischen Detektionsoptik und Probenoberfläche 7 mm beträgt. Damit kann auch durch transparente Deckel versiegelter Probenbehälter gemessen werden.
6. Der gesamte Messplatz wurde so konstruiert, dass er auf 1 m<sup>2</sup> Laborfläche aufgebaut werden kann.
7. Für jeden Probenbehälter wurde ein individueller Probenhalter konstruiert, der das präzise, rekonstruierbare Einspannen der Probe erlaubt.

8. Die Detektion der Photosensibilisator-Fluoreszenz geschieht durch ein kommerzielles Faserspektrometer.

### 3.1.2 Technische Umsetzung

Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten des Messplatzes vorgestellt, gefolgt von einer Skizzierung ihrer Interaktion während einer Messung.

#### Gerät zum zeitaufgelösten Nachweis von Singulett-Sauerstoff Lumineszenz

Im Zuge des EXIST-Projekts „Lumox“ wurde zusammen mit Dr. Steffen Hackbarth und Dr. Jan Caspar Schlothauer ein Detektionssystem für schwache NIR Lumineszenz entwickelt. Kernstücke sind ein Photomultiplier (Hamamatsu H10330), eine Detektionselektronik, die ähnlich einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung funktioniert und eine Detektionsoptik, die für den spektralen Bereich der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz optimiert ist. Das System ist modular konzipiert, sodass spektrale Filter und Aufsätze für Fasereinkopplung oder direkte Messungen in einer Küvette beliebig kombiniert und schnell getauscht werden können.

Der verwendete Hamamatsu H10330 ist ein InP/InGaAsP Photomultiplier für den spektralen Bereich zwischen 950 nm und 1400 nm. Durch eine große Detektionsfläche von 1,6 mm<sup>2</sup>, eine Quanteneffizienz<sup>2</sup> von 2 % bei 1270 nm und einem Dunkelrauschen von 2500 s<sup>-1</sup> ist dieser Photomultiplier derzeit am besten geeignet als Detektor für <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz Messungen. Ein Vergleich zu anderen aktuellen Nahinfrarot Detektoren ist in „*Current prospects of detectors for high performance time-resolved singlet oxygen luminescence detection*“ in [142] zu finden.

Um aus den Signalen des Photomultipliers ein zeitaufgelöstes Lumineszenz Signal zu erhalten, bedarf es einer Zähl- und Synchronisationselektronik. Die in diesem Detektionssystem verwendete Elektronik funktioniert ähnlich einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung. Getriggert durch einen selbst erzeugten oder externen Puls werden Photonen gezählt und entsprechend der Zeitdifferenz zwischen Anregungspuls und Detektion des Lumineszenz Photons in ein Histogramm einsortiert. Im Gegensatz zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung werden hier aber bis zu drei Photonen pro Anregungspuls gezählt. Die Detektionselektronik verfügt über 4096 Histogramm-Kanäle mit einstellbarer zeitlicher Kanalauflösung. Implementierte Kanalaufösungen sind derzeit **20 ns**, **40 ns** und **80 ns**. Die Architektur der Elektronik erlaubt aber auch längere Kanalaufösungen. Kürzere können derzeit nur bedingt realisiert werden. Eine USB 2.0 basierte Kommunikation

---

<sup>2</sup> Dies ist nur die laut Datenblatt zugesicherte Mindesteffizienz. Der verwendete Photomultiplier weist eine höhere Quanteneffizienz auf.

zwischen Elektronik und PC ermöglicht ein schnelles auslesen des Speichers sowie eine sehr direkte Steuerung des Detektionssystems.

Das Dunkelrauschen des Gesamtsystems liegt bei einer Kanalbreite von 20 ns meist im Bereich von etwa  $2000\text{ s}^{-1}$ . Da es sich auf die 4096 Kanäle gleich verteilt, entspricht es einem Rauschen von etwa einem Ereignis pro Kanal pro 2 Sekunden. Dieses Rauschen zeigt sich in den gemessenen Signalen in einem Offset, dessen Wert ungefähr der halben Messdauer entspricht.

Die spektrale Diskriminierung geschieht durch Module in denen eine abbildende Optik, ein Siliziumfilter und ein Interferenzfilter eingebaut sind. Es stehen dabei zwei Module zur Verfügung, die sich durch verschiedene Interferenzfilter unterscheiden. Ein Modul ist für  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz optimiert, das andere Modul ist für NIR Lumineszenzen bei 1230 nm optimiert, also beispielsweise Photosensibilisator Phosphoreszenzen. Abbildung 16 zeigt qualitativ die Transmissionsspektren der verwendeten Optiken und ein gemessenes  $^1\text{O}_2$  Phosphoreszenz Spektrum. Da die Filter direkt mit einer Linse verbunden sind konnte keine quantitative Messung der Transmission innerhalb der technischen Möglichkeiten durchgeführt werden.

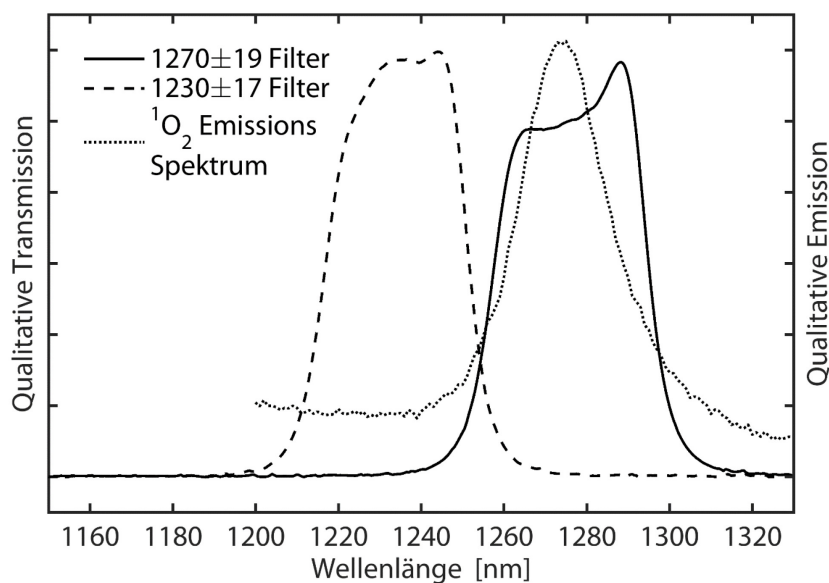


Abbildung 16: Qualitative Transmissionsspektren der verwendeten Filter zur Wellenlängenselektion bei zeitaufgelöster  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Detektion.

In diesem Messplatz wird die Lumineszenz durch eine Lichtleitfaser in das Detektionssystem geleitet. Dafür wird ein Modul verwendet, das über einem Steckverbinder für Lichtwellenleiter (F-SMA 905) verfügt. Licht aus Fasern bis zu einem Durchmesser von 2,4 mm und einer numerischen Apertur von 0,4 wird nahezu komplett auf den Detektor abgebildet.

## Fluoreszenz Detektion

Die Fluoreszenz des Photosensibilisators wird mit einem Hamamatsu C10083CAH Faserspektrometer detektiert. Dieses Spektrometer zeichnet sich durch eine kompakte Bauweise und eine für seine Größe hohe spektrale Auflösung von 1 nm aus. Es detektiert Lumineszenzsignale zwischen 320 nm und 1000 nm durch einen Silizium CCD-Sensor mit 2048 Pixeln. Die mit 16 Bit digitalisierten Messdaten werden per USB an einen PC übertragen.

Das detektierte Licht wird durch eine 600 µm Detektionsfaser in einen optischen Kubus geleitet. In diesem Kubus wird das Licht durch eine Linse annähernd parallelisiert. Es transmittiert einen Dichroitischen Spiegel und einen 450 nm Langpass-Interferenzfilter, bevor es in die Faser des Spektrometers eingekoppelt wird. Durch diesen Kubus ist eine gleichzeitige Messung von spektral aufgelöster Fluoreszenz und zeitaufgelöster NIR Lumineszenz möglich. Die parallelisierende Optik ist für Fasern mit einem maximalen Durchmesser von 600 µm geeignet, sodass die Verwendung einer Faser mit größerem Durchmesser zu starken Signalverlusten führt.

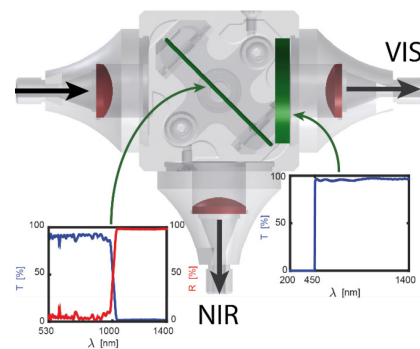


Abbildung 17: optische Separation von VIS und NIR Licht.

## Anregungslaser

Als Anregungslaser wurde ein OMIKRON LDM405D gewählt. Dieser Diodenlaser bringt bei einer Wellenlänge von 405 nm eine maximale cw-Leistung von  $P_{cw} = 1,2$  W. Durch analoge oder digitale Modulation mit einer Bandbreite bis 15 MHz (analog) beziehungsweise 150 MHz (digital) können Anregungspulse erzeugt werden. Die Modulation geschieht dabei durch das Singulett-Sauerstoff Detektionssystem. Dieses verfügt über einen Synchronisationspuls, dessen zeitliche Breite per Software veränderbar ist. Sie beträgt minimal die doppelte Kanalauflösung des  $^1O_2$  Lumineszenz Detektionssystems ( $\Delta t_{KA} = 40$  ns, 80 ns oder 160 ns) und kann in Schritten  $n$ , die der Kanalauflösung entsprechen, variiert werden. Die Anregungspulsenergie kann also folgendermaßen berechnet werden:

$$P_{exc} = \tau_{Puls} \cdot P_{cw} = n \cdot \Delta t_{KA} \cdot P_{cw} \quad \text{für } n \geq 2$$

Für die Standardeinstellung der Steuersoftware von  $\tau_{Puls} = 240$  ns ergibt sich demnach eine Anregungspulsenergie von  $P_{exc} = 0,3$  µJ. Diese Anregungsenergie ist ein guter Kompromiss zwischen genügend hoher Anregungsenergie für ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis

und genügend geringer Anregungsenergie um den Einfluss auf die Probe zu minimieren. In den nachfolgend vorgestellten Messungen werden nur dann explizit Anregungspulsenergien angegeben, wenn von diesem Standard von 0,3  $\mu\text{J}$  abgewichen wird.

### Anregungs- und Detektions- Lichtweg

Abbildung 18 skizziert den optischen Weg des Anregungs- und Detektionslichts. Gemäß den in 3.1.1 formulierten Designzielen stand bei der Planung der optischen Wege des Anregungs- und Detektionslichts die möglichst effiziente Sammlung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz einer wenige hundert Quadratmikrometer großen Probenoberfläche im Vordergrund. Dabei wurde auf kommerziell erhältliche optische Komponenten zurückgegriffen.

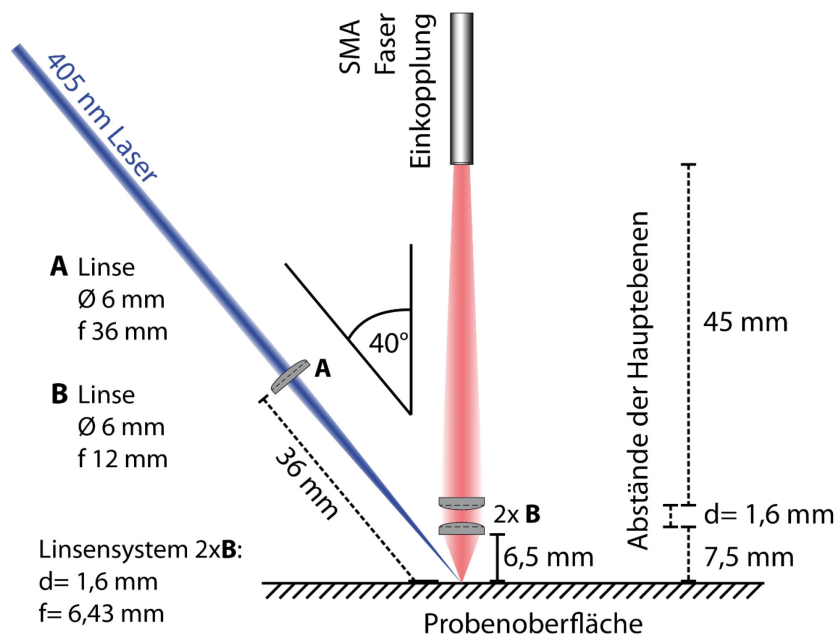


Abbildung 18: Skizze der Anregungs- und Detektions-Optik. Das Anregungslicht wird in einem Winkel von 40° durch eine Linse auf die Probenoberfläche fokussiert. Senkrecht zur Probenoberfläche wird die durch den Laser angeregte Fläche durch ein Linsensystem mit einer 6-fachen Vergrößerung auf eine Faser abgebildet.

Ein Linsensystem aus zwei Detektionslinsen (NIR antireflexbeschichtet,  $f= 12\text{ mm}$ ,  $\text{Ø}= 6\text{ mm}$ , Abstand der beiden Linsenebenen 1,6 mm) bildet die Probenoberfläche mit einem Abbildungsmaßstab von

$$\frac{45\text{ mm}}{7,5\text{ mm}} = 6$$

auf eine Faser ab. Es stehen zwei verschiedene Detektionsfasern zur Verfügung. Eine Faser mit einem Durchmesser von 600  $\mu\text{m}$  und einer numerischen Apertur von 0,39 und eine mit einem

Durchmesser von 2000  $\mu\text{m}$  und einer numerischen Apertur von 0,4. Die Transmission beider Fasern ist für den NIR Bereich optimiert. Den Durchmessern der Fasern entsprechend wird eine Fläche mit einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  (für die  $\varnothing$  600  $\mu\text{m}$  Faser) beziehungsweise 333  $\mu\text{m}$  (für die  $\varnothing$  2000  $\mu\text{m}$  Faser) durch die Faser erfasst.

Abbildung 19 zeigt die Realisierung der Anregungs- und Detektionsgeometrie mit der Position der Linsen. Die Gegenstandsweite wurde so gewählt, dass der Abstand zwischen der probenseitigen Linsenfläche und der Probe 6,5 mm beträgt. Aus dem probenseitigen Abstand und dem Durchmesser der Detektionslinsen ergibt sich eine probenseitige numerische Apertur von 0,37. Die bildseitige numerische Apertur beträgt 0,07 und ist somit kleiner

als die der verwendeten Detektionsfasern. So wird Lumineszenz aus einem möglichst großen Raumwinkel eingefangen und eine Anregung schräg an der Detektionsoptik vorbei ist noch möglich (in einem Winkel von  $40^\circ$ ). Der Abstand zur Probe darf dabei nicht geringer sein, da es bei stark kontaminierenden Proben möglich sein muss, durch eine Quarzglasscheibe oder den Deckel einer Petrischale messen zu können.

Eine schräge Anregung wurde gewählt um mögliche Streueffekte durch das Anregungslicht zu minimieren. Eine räumliche Überlappung von Anregungs- und Detektionsvolumen ist für eine Detektion notwendig. Auf Grund der Anregung in einem  $40^\circ$  Winkel ist die Optik stark abhängig von präziser Justierung des Abstands der Optik zur Probe einerseits und setzt andererseits eine flache, homogene Probenoberfläche voraus, um Flächen abzurastern. In den meisten Fällen dienen Agarplatten als Probensubstrat, die eine flache, homogene Oberfläche aufweisen. Um die Justierung der räumlichen Überlappung zu erleichtern, kann ein roter Diodenlaser (Sintron LP-702, 650 nm, 2-4 mW) mit selbstkonstruierter SMA-Fasereinkopplung an die Detektionsfaser angeschlossen werden.

Der Anregungslaserstrahl wird durch eine Linse (405 nm antireflexbeschichtet,  $f=36\text{ mm}$ ,  $\varnothing=6\text{ mm}$ ) auf die Probenoberfläche fokussiert. Aus dem Einfallswinkel und dem Fokusdurchmesser ergibt sich eine Anregungsgeometrie wie sie in

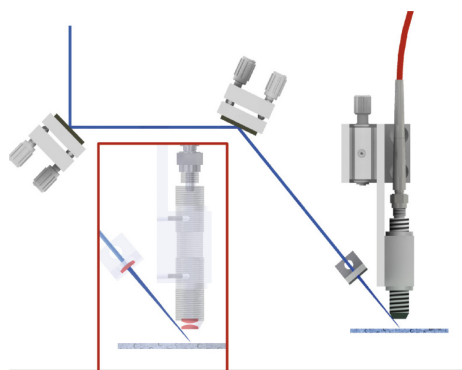


Abbildung 19: Anregungs- und Detektionsgeometrie. Das rot umrandete Bild verdeutlicht die Position der Fokussierungslinse des Anregungs-Laserstrahls und die beiden Detektionslinsen.

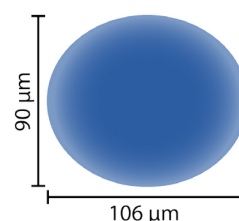


Abbildung 20: Geometrie des ideal fokussierten Anregungslaserstrahles.

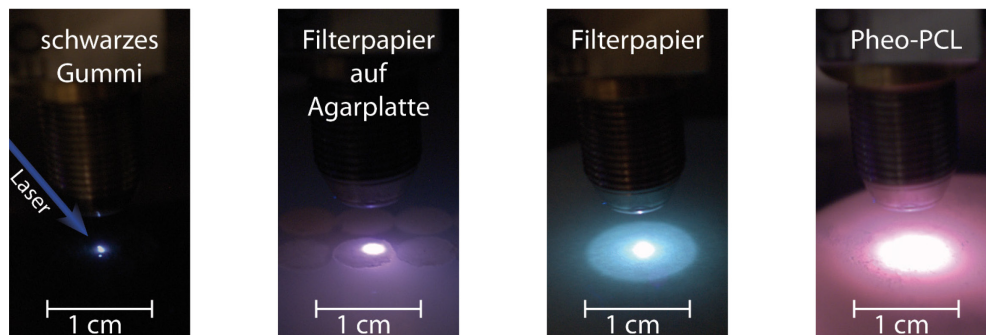


Abbildung 21: Fotos zur Veranschaulichung der Streuung des Anregungslichts auf verschiedenen Proben. Der Weg des Anregungslasers ist im rechten Foto skizziert. Die Rotfärbung auf dem Filterpapier auf der Agarplatte (zweites Foto von links) und der Pheo-PCL Probe (rechts) sind durch die Fluoreszenz des applizierten Photosensibilisators bedingt.

Abbildung 20 dargestellt ist. Bei den meisten bisher betrachteten Proben kam es aber zu einer streuungsbedingten Vergrößerung der Anregungsgeometrie.

Abbildung 21 zeigt Fotos des fokussierten Anregungslaserstrahls auf verschiedenen Probenoberflächen, die diese Vergrößerung illustrieren sollen. Der Weg des Anregungslaser ist im rechten Foto in Abbildung 21 beispielhaft skizziert. Die schwarze Gummimatte dient aufgrund der geringen Streuung als Justierungshilfe. Pheo-PCL ist die Bezeichnung einer Photosensibilisator-Polymer Probe, die in Abschnitt 3.2 vorgestellt und zur Charakterisierung des Messplatzes verwendet wird. Durch die individuellen Streueigenschaften einer jeden Probe lässt sich deshalb die Anregungsgeometrie nur bedingt exakt bestimmen.

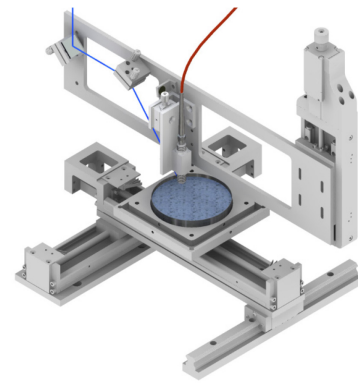
## Mechanik

Die Mechanik besteht aus einem Probentisch, der sich in x- und y- Richtung bewegen lässt und einer sich in z-Richtung bewegender Anregungs- und Detektionsoptik.

Dafür werden für die x- und y-Richtung Linearachsen (Hiwin K5002P025) mit einem Verfahrweg von 25 cm und einer Spindelsteigung von 2 mm verwendet. Die Bewegung in z-Richtung wird durch eine Linearachse (Owis MTM 60-45-MiDS) mit einem Verfahrweg von 45 mm und einer Spindelsteigung von 0,5 mm ermöglicht. Angetrieben werden die Achsen von Schrittmotoren (Trinamic QSH-4218-41-10-049). Diese werden gesteuert durch eine selbstkonstruierte, auf einem Trinamic TMCM-310 basierende Schrittmotorsteuerung.



Die Probe lässt sich dadurch in x- und y-Richtung in einem Bereich von 25 cm und mit einer Genauigkeit von 20 µm frei verfahren. Die Anregungs- und Detektionsoptik lässt sich um 4,5 cm mit einer Genauigkeit von 10 µm verfahren. Eine Illustration der Mechanik, der Anregungs- und Detektionsoptik und einer Probe ist in Abbildung 22 zu sehen.



### **Probenaufnahme und Maßnahmen zur Repositionierbarkeit**

*Abbildung 22: Illustration des Probentisches, der Anregungs- und Detektionsoptik und einer im Probenhalter fixierten Petrischale.*

Um reproduzierbare Messungen durchführen zu können, wurden Probenhalter für verschiedene Standard-Probenbehälter wie Petrischalen oder Mikrotiterplatten konstruiert. Diese werden auf verschiedenen Probentischen fixiert, die auf eine Achse geschraubt werden. Abbildung 22 zeigt eine Illustration der drei Achsen mit einem Probentisch und der Anregungs- und Detektionsoptik.

Die Probenbehälter werden im jeweiligen Probenhalter fixiert, welcher wiederum auf dem Probentisch fixiert ist. Auf diese Weise kann eine immer gleiche Fläche der Probe reproduzierbar gescannt werden. Insbesondere bei Petrischalen oder anderen kreisrunden Proben oder Probenbehältern ist zudem eine Markierung an Probe oder Probenbehälter notwendig, um mit Dieser und einer eingefrästen Markierung am Probenhalter eine Änderung des Horizontalwinkels zu verhindern.

### 3.1.3 Aufbau des Programms zur Bedienung des Messplatzes

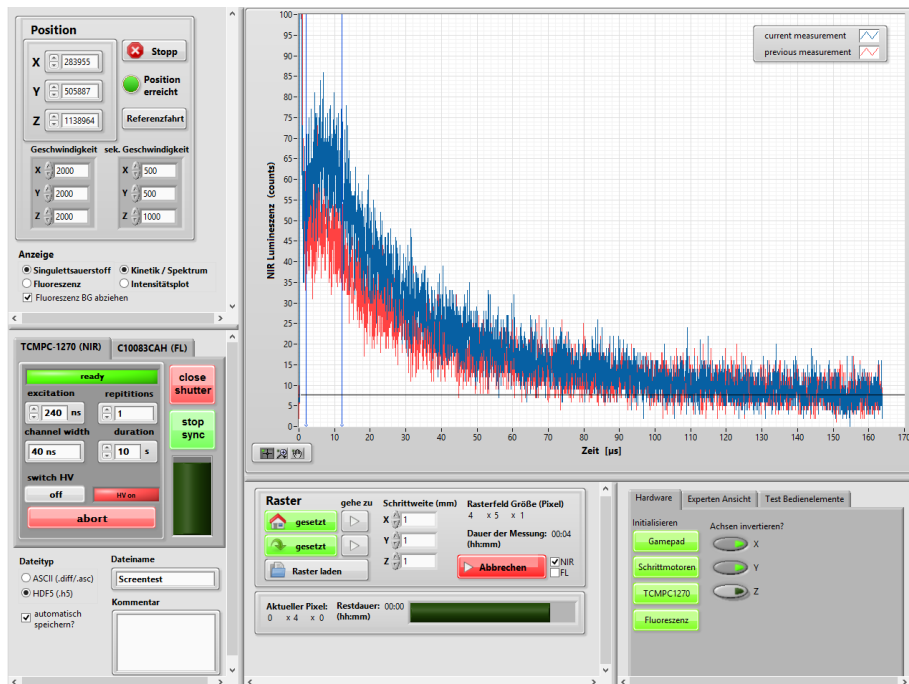


Abbildung 23: Benutzeroberfläche des Programms zur Bedienung des Messplatzes. Links oben ist die Steuerung des Probestisches (x,y Bewegung) und der Detektionsoptik (z Bewegung). Links unten ist die Bedienung der angeschlossenen Geräte. Mittig unten ist die Bedienung einer Raster Messung. Rechts unten sind weitere Einstellungen möglich.

Die Anforderungen an das Programm zur Bedienung des Messplatzes waren die Folgenden:

- Langzeitstabilität und softwareseitige Schutzmechanismen um eine mechanische Beschädigung der Probe oder der empfindlichen Detektionsoptik zu vermeiden
- Einfache und intuitive Navigation der drei Achsen sowie der einzelnen Komponenten
- Definierte Abrasterung von Oberflächen
- Möglichkeit der schnellen und einfachen  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz oder Fluoreszenz Detektion an einem einzelnen Punkt
- Eine Softwarearchitektur mit hoher Modularität für die Erweiterung beziehungsweise den einfachen Austausch der Hardware und der einfachen Implementierung weiterer Funktionen.

Das Programm wurde mit dem grafischen Programmiersystem LabVIEW von National Instruments implementiert. Die Softwarearchitektur besteht aus mehreren parallel ablaufenden Zustandsautomaten. Gesteuert werden diese Zustandsautomaten durch Zustandswarteschlangen (engl. *Queues*), die durch Benutzeraktionen oder programmatisch mit Aktionen besetzt werden. Neben einem Zustandsautomaten für jedes angeschlossene Gerät gibt es einen für die grafische Anzeige und die Festplatteninteraktion und einen für die Steuerung von Rastermessungen. Neben der Bedienung des Programms über Eingaben auf der Benutzeroberfläche ist die Steuerung über ein Gamepad möglich, wodurch die Navigation der drei

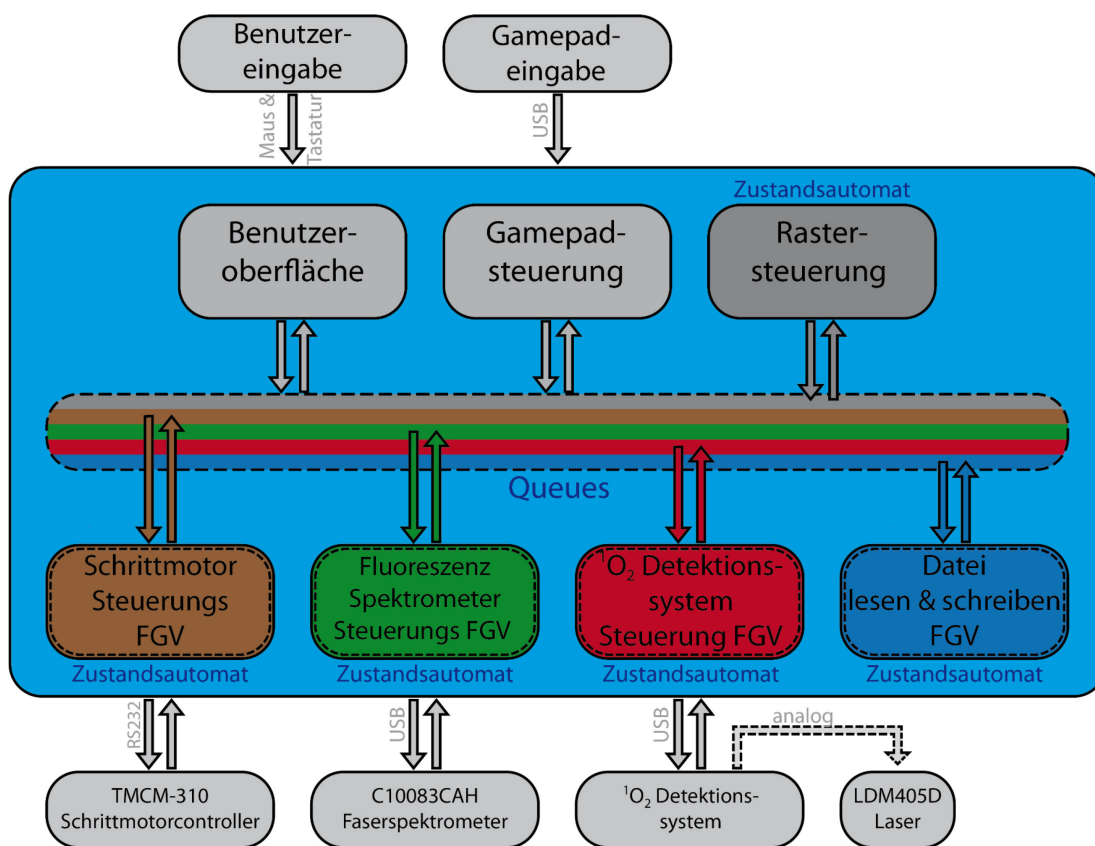


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Softwarearchitektur des Programms zur Bedienung des Messplatzes.

beweglichen Achsen erheblich intuitiver ist. Abbildung 24 zeigt eine schematische Darstellung der Softwarearchitektur.

Die gewählte Softwarearchitektur bietet hohe Modularität durch die Unabhängigkeit der einzelnen Zustandsautomaten. Weitere Zustandsautomaten können mit absehbarem Aufwand hinzugefügt werden. Innerhalb der Zustandsautomaten werden wiederum *Funktionale Globale Variablen* (FGV) verwendet, ein LabView-Pendent zu Objekten, wie sie in der objektorientierten Programmierung

zum Einsatz kommen. Das Konzept der FGVs erlaubt auf unkomplizierte Weise den Austausch oder die Erweiterung der Hardware sowie den Austausch der Software bei anderweitigem Einsatz der Hardware.

Die Steuerung über Queues impliziert definierte Kommunikationswege und sorgt dadurch für hohe Stabilität des Programms. Zudem wurde bei der Programmierung darauf geachtet, dass in Hardware-Zustandsautomaten nahezu alle Zustände innerhalb weniger Millisekunden abgearbeitet werden, sodass ein Eingriff des Benutzers oder eines anderen Teils der Software jederzeit möglich ist. Diese Möglichkeit des Eingriffs ist besonders wichtig für softwareseitige Schutzfunktionen des Detektors und der mechanischen Achsen. So wird beispielsweise der Verschluss des NIR-Detektors bei zu starken Signalen schnellst möglich geschlossen oder ein Schrittmotor automatisch oder über Benutzereingaben sofort gestoppt, wenn die Beschädigung der Probe oder der Detektionsoptik droht.

Die Funktionalität umfasst die Bewegung von Probe und Detektionsoptik, Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Messungen an einem Punkt und Rastermessungen von Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf rechteckigen Flächen. Die Messdaten können wahlweise im ASCII oder HDF5

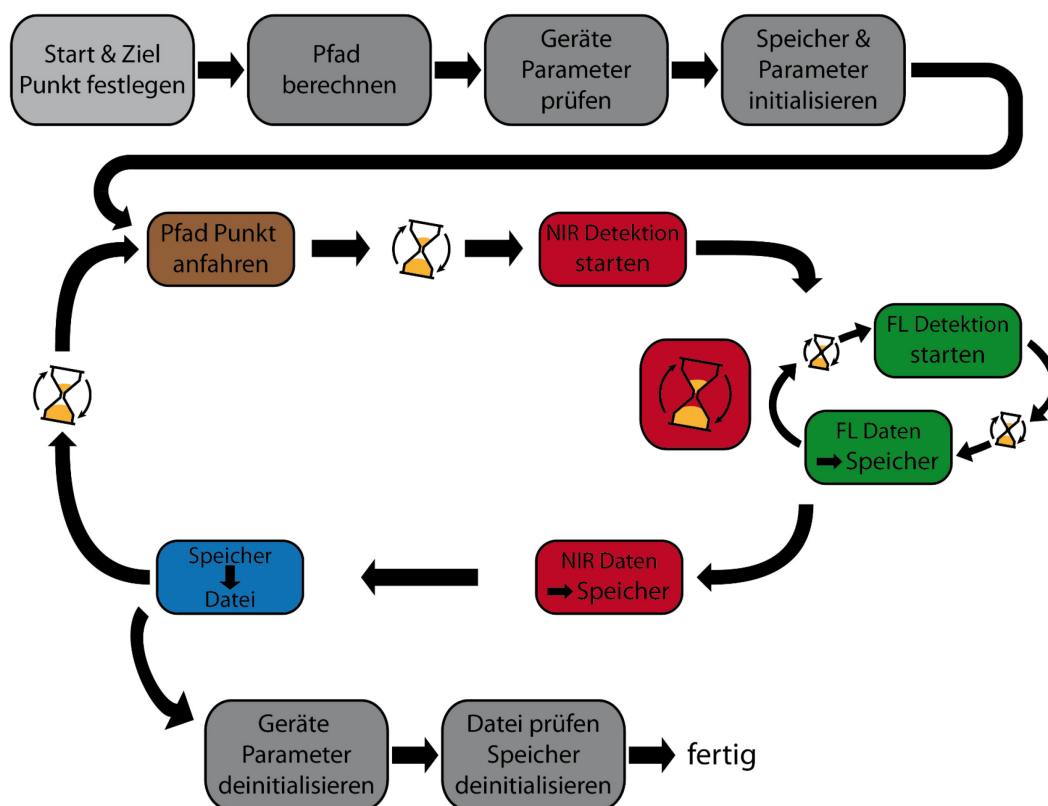


Abbildung 25: Prozessablaufdiagramm während einer Rastermessung.

Dateiformat gespeichert werden. Während Daten aus ASCII Dateien leicht in nahezu alle Auswerteprogramme importiert werden können, bietet der binäre HDF5 Datentyp den Vorteil, dass auch große Datenmengen, wie sie bei einer Rastermessung anfallen, kompakt und strukturiert gespeichert werden.

Zur Verdeutlichung der Funktionalität des Bedienprogramms zeigt Abbildung 25 ein Prozessablaufdiagramm des Bedienprogramms während einer Rastermessung. Es zeigt wie die Zustandsautomaten miteinander interagieren. Gesteuert wird der Prozess von dem Rastersteuerung-Zustandsautomaten. Eine Messung der NIR Lumineszenz dauert meist mehrere Sekunden, während die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums nur wenige hundert Millisekunden dauert. Deshalb werden über den gesamten Zeitraum der NIR Detektion Fluoreszenzspektren aufgenommen und gespeichert.

## 3.2 Möglichkeiten und Grenzen des Messplatzes

Im Folgenden werden einige Eigenschaften des neuen Messplatzes charakterisiert. Dabei werden vor allem die Messungen zur Charakterisierung der zeitaufgelösten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz vorgestellt, da eine Charakterisierung der Fluoreszenzmessungen an dem neuen Messplatz in der Masterarbeit von Christian Fischer zu finden ist [37]. Im gesamten Verlauf dieser Arbeit werden nur Messparameter angegeben, wenn sie von den im Folgenden aufgeführten Standardwerten abweichen:

- Verwendete Detektionsfaser:  $\varnothing$  600  $\mu\text{m}$  Faser für Fluoreszenzdetektion  
 $\varnothing$  2000  $\mu\text{m}$  Faser für NIR Lumineszenzdetektion
- Anregungsenergie: 0,3  $\mu\text{J}$
- Integrationszeit des Fluoreszenzspektrometers: 200 ms
- Messdauer (pro Pixel) der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzdetektion: 10 s
- Kanalbreite des  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Detektionssystems: 20 ns
- Schrittweite bei Scans in x- und y-Richtung: 1 mm

Bevor Eigenschaften des neuen Messplatzes untersucht werden konnten war die Suche nach einem geeigneten Testsystem notwendig. Der vorrangige Anspruch an dieses System war eine konstante Generierung von  $^1\text{O}_2$ , sodass über lange Zeit ein  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzsignal mit gleichbleibender Kinetik messbar ist.

Systeme, die diesem Anspruch gerecht werden sind in Polycaprolacton (PCL) immobilisierte Photosensibilisatoren. Dafür wurde PCL Granulat in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst. Der jeweilige Photosensibilisator wurde vorher in der in

Tabelle 2 angegebenen Konzentration dem organischen Lösungsmittel zugefügt. Für die Phäophorbid a Probe wurde Chloroform als Lösungsmittel verwendet, für alle anderen Photosensibilisatoren wurde Dichlormethan verwendet<sup>3</sup>. Das Lösungsmittel wurde dann mit Hilfe einer Abdampfschale verdampft.

---

<sup>3</sup> Abgesehen von der Pheo-PCL Probe wurden die Proben dankenswerterweise von Alexander Müller hergestellt.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der vier eingebetteten Photosensibilisatoren mit der entsprechenden Konzentrationen. Diese Proben werden mit *Photosensibilisator*-PCL Probe (z.B. TMPyP-PCL) bezeichnet. Fotos der vier Proben sind in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** gezeigt.

*Tabelle 2: Übersicht der in PCL immobilisierten Photosensibilisatoren*

Abk.	Photosensibilisator	CAS Nr.	Konzentration
Pheo	Phäophorbid a	15664-29-6	1000 µM
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate)	36951-71-1	300 µM
ZnPcF16	Zinc 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29H,31H-phthalocyanine	31396-84-6	300 µM
Eo	Eosin B	548-24-3	300 µM

**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt die in 60 s gemessenen  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Signale der in

Tabelle 2 aufgeführten Proben. Auffällig ist zum einen das deutlich stärkere Signal der Pheo-PCL Probe sowie zum anderen das Signal der Eo-PCL Probe, dass offensichtlich nicht einer bi-exponentiellen Kinetik folgt. Während die erste Beobachtung auf die vergleichsweise deutlich höhere Konzentration des Pheos in der Pheo-PCL Probe zurück zu führen ist, gibt es für keine triviale Erklärung für die Kinetik des Signals, dass and der Eo-PCL Probe gemessen wurde. Diese Kinetik weist jedoch eine Ähnlichkeit zu der Kinetik auf, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit an biologischen Systemen beobachtet werden. Aus diesem Grund wird auch sie, ungeachtet der Ursache, im Folgenden diskutiert.

Bisher wurden keine Anzeichen für ein Ausbleichen der Photosensibilisatoren festgestellt. Auch die Kinetik bleibt über lange Zeit nahezu konstant. Daher eignen sich diese Proben gut als Langzeitreferenz.

Im Folgenden werden verschiedene Messungen zur Charakterisierung des Messplatzes und allgemeine Eigenschaften der Messungen an diesem Messplatz vorgestellt. Dabei werden vor allem Parameter der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik und deren 95%-Konfidenzintervalle herangezogen.

### 3.2.1 Vertikale Justierungsempfindlichkeit

Aufgrund der oben beschriebenen Anregung im Winkel von  $40^\circ$ , ist bei Messungen auf Oberflächen eine möglichst exakte Justierung des Abstands zwischen Detektionslinsensystem und der

Probenoberfläche essentiell für das Signal-Rausch-Verhältnis. Wie bereits erwähnt kann zur Erleichterung der Justierung ein Justierungslaser in die Detektionslichtleitfaser eingekoppelt werden. Um die Empfindlichkeit der vertikalen Justierung zu demonstrieren und zu quantifizieren, wurden Messungen der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz mit variierendem vertikalen Probenabstand durchgeführt.

Als Probe diente die bereits beschriebene TMPyP-PCL Probe. Die Streuung des Anregungslichts an der Oberfläche dieser Probe ist im Vergleich zu anderen Probe, die in dieser Arbeit untersucht wurden, als durchschnittlich zu betrachten.

Zunächst wurde der optimale Abstand mit Hilfe des Justierungslasers ermittelt. Dafür wurde der Justierungslaser in den Detektionslichtweg eingekoppelt und der Abstand zwischen Probe und Detektionsoptik so eingestellt, dass sich das Licht des Justierungslasers mit dem Anregungslicht überlappt. Dieser Abstand wurde dann um mehrere Millimeter in beide vertikale Richtungen variiert. An jedem Punkt wurde eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzmessung durchgeführt.

Die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz wurde für jeweils 10 s gemessen. Der Probenabstand wurde in 0.2 mm Schritten in beide Richtungen um die optimale Position variiert. Abbildung 26 zeigt die aus den Daten ermittelten  $^1\text{O}_2$  Amplituden mit den jeweiligen Konfidenzintervallen auf der x-Achse und den vertikalen Verfahrweg um den optimalen Probenabstand herum auf der y-Achse.

Innerhalb der Konfidenzintervalle stimmen die Amplituden in einem Bereich von -0.2 bis 0.4 mm überein. Dementsprechend ist bei „normal“ streuenden Proben eine Justierung innerhalb eines halben Millimeters für optimale Messergebnisse notwendig.

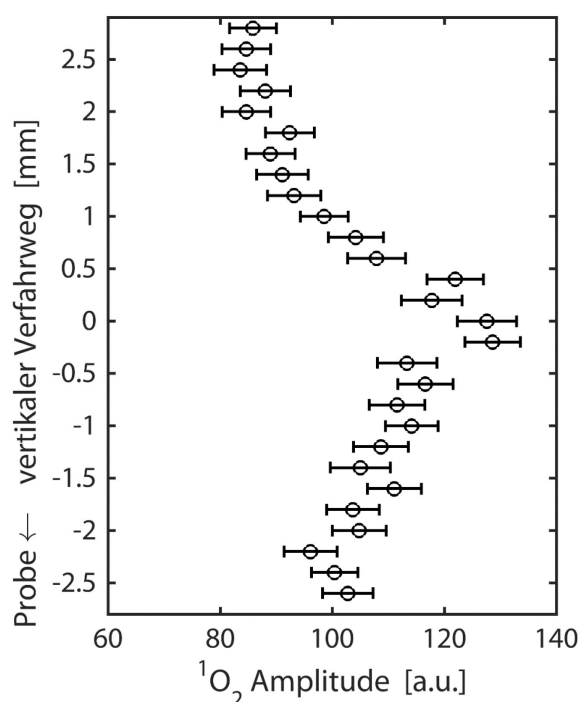


Abbildung 26:  $^1\text{O}_2$  Amplituden der TMPyP-PCL Probe bei Variation des vertikalen Abstands zur Probe um die optimale Position.



### 3.2.2 Vergleichbarkeit der Singulett-Sauerstoff Lumineszenzkinetik mehrerer, direkt nacheinander durchgeführter Messungen

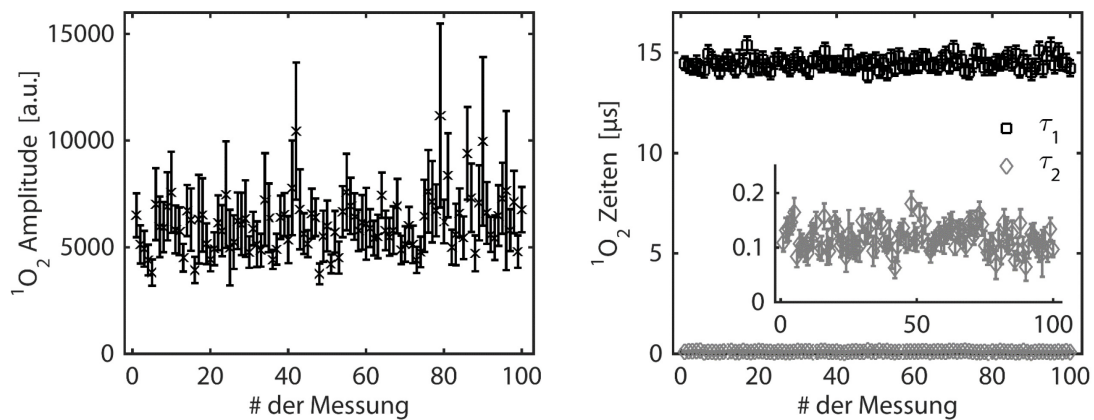


Abbildung 27: Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Amplituden (links) und den An- und Abklingzeiten (rechts) von 100 direkt hintereinander durchgeführten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Messungen an Pheo in Ethanol. Das Inset der rechten Abbildung zeigt den Verlauf der Anklingzeit  $\tau_2$  detaillierter. Sowohl die  $^1\text{O}_2$  Amplitude als auch die An- und Abklingzeit bleibt über 100 Messungen nahezu konstant.

Um die Vergleichbarkeit mehrerer, direkt nacheinander durchgeführter Messungen zu untersuchen, wurden zwei Experimente durchgeführt. An einem Photosensibilisator in Lösung und einer Probe mit immobilisiertem Photosensibilisator (TMPyP-PCL) wurde 100-mal direkt hintereinander die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz für je 10 s gemessen.

Als Probe in Lösung wurde eine Küvette mit einer hochkonzentrierten Pheo-Ethanol Lösung verwendet (Konzentration ca. 50  $\mu\text{M}$ ). Abbildung 27 zeigt die Verläufe der  $^1\text{O}_2$  Amplitude, der An- und der Abklingzeit. Abgesehen von wenigen Ausreißern ist zu sehen, dass in Lösung keine Tendenzen zu beobachten sind.

Die Verläufe der Amplitude und der An- und Abklingzeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik, die auf der Oberfläche der TMPyP-PCL detektiert wurde, ist in Abbildung 28 dargestellt. Der Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Amplitude (Abbildung 28 links) zeigt eine fallende Tendenz. Während die Anklingzeit nahezu konstant bleibt, steigt die Abklingzeit über 100 Messungen.

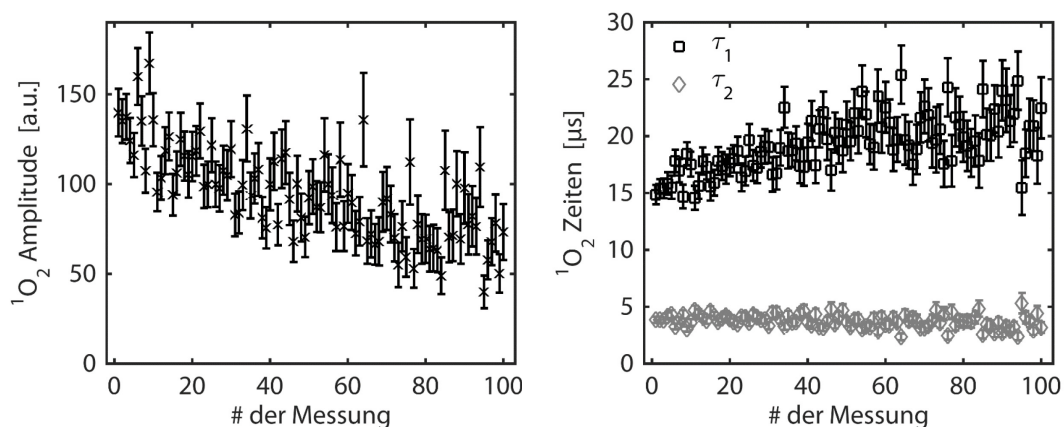


Abbildung 28: Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Amplituden (links) und den An- und Abklingzeiten (rechts) von 100 direkt hintereinander durchgeführter  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Messungen an TMPyP-PCL. Die  $^1\text{O}_2$  Amplitude zeigt eine fallende Tendenz. Die Abklingzeit  $\tau_1$  zeigt eine steigende Tendenz, während die Anklingzeit  $\tau_2$  nahezu konstant bleibt

Bei Messungen in Lösung oder Suspension ist ein diffusionsbedingter Austausch von Photosensibilisatoren, Lösungsmittel und lokaler Sauerstoffkonzentration im untersuchten Probenvolumen gegeben. Falls dieser Austausch nicht unmittelbar gegeben ist, hilft der Einsatz von Rührern. Aus diesem Grund bleiben sowohl Amplitude als auch die Triplett- und  $^1\text{O}_2$ -Lebensdauer konstant.

Bei Messungen auf Oberflächen ist dieser Austausch stark eingeschränkt. Da der Photosensibilisator in der Polymermatrix immobilisiert ist, findet kein Austausch des Photosensibilisators innerhalb des Anregungs- und Detektionsvolumens statt. Nach mehrfacher Anregung eines immer gleichen Probenvolumens kann zu einer Änderung der lokalen  $\text{O}_2$ -Konzentration oder der lokalen  $^1\text{O}_2$  Quencherkonzentration oder zum Ausbleichen des Photosensibilisators kommen. Solche lokalen Änderungen führen zu Tendenzen der Kinetikparameter, wie sie in der Messreihe der TMPyP-PCL Probe zu beobachten sind.

Die Parameter der beiden vorgestellten Messreihen sind unter Berücksichtigung der ab beziehungsweise zunehmenden Tendenzen bei der Messreihe an TMPyP-PCL gut reproduzierbar. Es zeigen sich keine messplatzspezifischen systematischen Fehler bei mehrfach direkt hintereinander durchgeführten Messungen. Allerdings muss bei  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Messungen mit einer Änderung der Kinetik während längerer Messreihen gerechnet werden, wenn Systeme mit einer eingeschränkten Diffusion der Photosensibilisatoren, des  $\text{O}_2$  oder möglicher Quenchemoleküle untersucht werden.

### 3.2.3 Langzeitvergleichbarkeit der Singulett-Sauerstoff

#### Lumineszenzkinetik

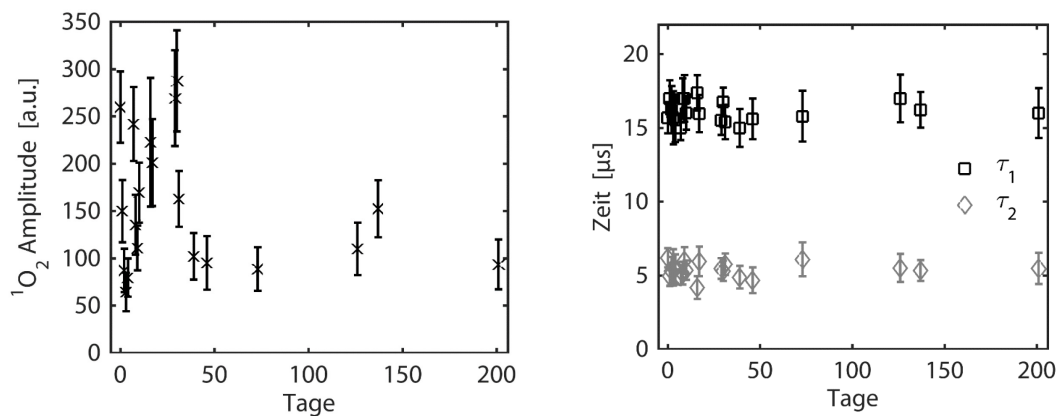


Abbildung 29: Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Amplituden (links) und den An- und Abklingzeiten (rechts) von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Messungen an TMPyP-PCL über einen Zeitraum von 200 Tagen.

Eine weitere zu charakterisierende Eigenschaft des Messplatzes ist die Reproduzierbarkeit von Messungen über viele Tage. Dafür wurde über einen Zeitraum von 200 Tagen die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an der TMPyP-PCL Probe unter gleichen Bedingungen für jeweils 10s gemessen. Abbildung 29 zeigt die aus dieser Messreihe bestimmten  $^1\text{O}_2$  Amplituden, sowie die An- und Abklingzeiten der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik. Die An- und Abklingzeit stimmt mit wenigen Ausnahmen innerhalb ihrer Konfidenzintervalle überein. Die Amplituden streuen jedoch stark innerhalb der ersten 31 Tage zwischen dem Minimalwert  $65 \pm 20$  und dem Maximalwert  $288 \pm 54$ .

Als Hauptursache der starken Schwankung der  $^1\text{O}_2$  Amplitude wird ein Defekt des verwendeten Photomultipliers vermutet, der nach etwa 30 Tagen provisorisch behoben werden konnte. Dieser Defekt verursachte starke Differenzen des Dunkelrauschens und hatte dadurch vermutlich auch Auswirkungen auf die Detektionsempfindlichkeit. Die Amplituden ab Tag 39 zeigen deutlich geringere Schwankungen. Bis auf die  $^1\text{O}_2$  Amplitude an Tag 137 stimmen die Amplituden innerhalb ihrer Konfidenzintervalle ab Tag 39 überein.

Die Messreihe zeigt, für die TMPyP-PCL Probe über mehrere Tage gleiche An- und Abklingzeiten der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik bestimmt werden können. Der Vergleich der Amplituden über mehrere Tage zeigt deutlich stärkere Schwankungen. Bei Messreihen über mehrere Tage ist es vorteilhaft, wenn Amplituden nur relativ zu einer Referenz, aufgenommen am gleichen Tag, verglichen werden. Die Messreihe zeigt abschließend, dass die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik einer Probe über mehrere Tage vergleichbar ist.

### 3.2.4 Vergleichbarkeit und Schwankung der Singulett-Sauerstoff

#### Lumineszenzkinetik bei einem 2D-Scan

Beim Scan einer Oberfläche wird ein Rechteck mit Seitenlängen von meist wenigen Zentimetern abgerastert. Die Schrittweite, also der Abstand zwischen zwei Punkten wird dabei so gewählt, dass sie größer ist als die Auflösung bei der Detektionsoptik mit der jeweiligen Faser. Dementsprechend beträgt die Mindestschrittweite bei Verwendung der 2000  $\mu\text{m}$  Faser 0,3 mm und 0,1 mm bei Verwendung der 600  $\mu\text{m}$  Faser. Die Standardeinstellung der Software für die Schrittweite beträgt 1 mm.

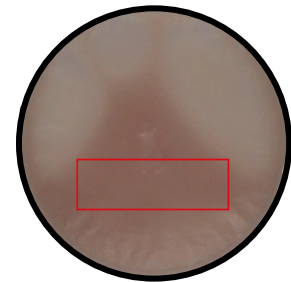


Abbildung 30: Foto der TMPyP-PCL Probe mit markiertem Scan Bereich.

An dieser Stelle wird am Beispiel einer homogenen Probe untersucht, wie stark die Schwankung zwischen zwei benachbarten Punkten eines Scans im Vergleich zu den numerischen Vertrauensintervallen der errechneten Parameter ist. Zu diesem Zweck wurde die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf einer möglichst homogenen Fläche der TMPyP-PCL Probe gescannt (siehe Abbildung 30). Zunächst wurde jeder Pixel isoliert mit einem Modell angepasst, das in Kapitel 3.3 näher beschrieben wird, um die  $^1\text{O}_2$  Amplitude und die Lebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und ihre jeweiligen 95 %-Konfidenzintervalle zu bestimmen. Abbildung 31 zeigt einen

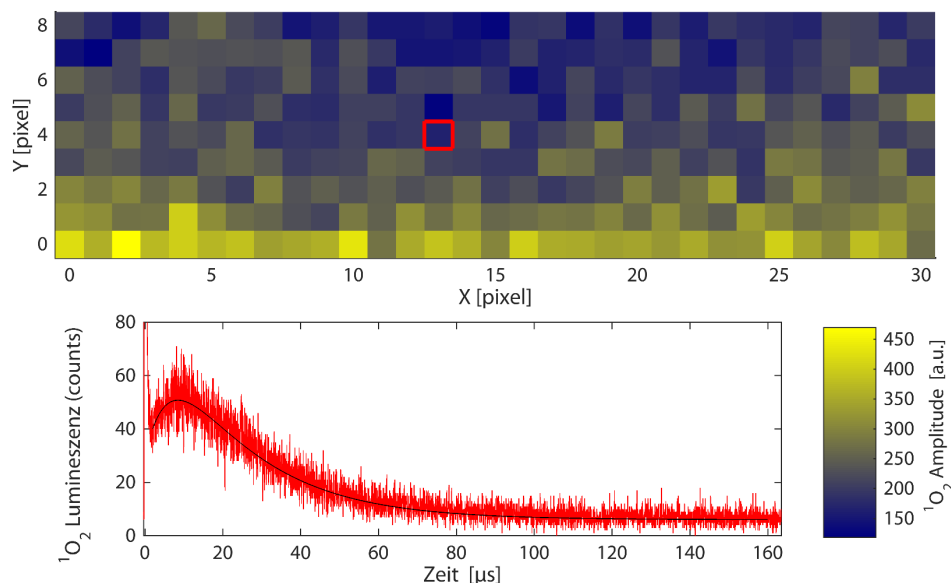


Abbildung 31: Intensitätsplot der  $^1\text{O}_2$  Amplitude und gemessene  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz eines Pixels mit Fit des entsprechenden Kinetikmodells der TMPyP-PCL Probe. Die Ursache der leichten vertikalen Tendenz der Amplituden ist eine leichte Krümmung der Oberfläche der TMPyP-PCL Probe.

Intensitätsplot der errechneten  $^1\text{O}_2$  Amplituden, sowie beispielhaft die gemessene  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz mit dem Fit des entsprechenden Kinetikmodells für einen Pixel. Die Ursache der vertikalen Tendenz der  $^1\text{O}_2$  Amplitude ist eine leichte Krümmung der Oberfläche der TMPyP-PCL Probe.

Um die Schwankung zwischen einem Punkt und seinen Nachbarn zu quantifizieren wurde für die  $^1\text{O}_2$  Amplitude,  $\tau_1$  und  $\tau_2$  die Verteilungen der Konfidenzintervalle der Parameter über den gesamten Scan mit den Verteilungen der jeweiligen mittleren quadratischen Differenzen zu den Nachbar Pixeln verglichen. Dafür wurden für die drei Parameter  $^1\text{O}_2$  Amplitude ( $A_0$ ),  $\tau_1$  und  $\tau_2$  die Verteilungen der Parameter und ihrer Konfidenzintervalle über den gesamten Scan ermittelt und durch eine Gauss-Verteilung angefitet. In Abbildung 32 ist beispielhaft die Verteilung von  $A_0$ , sowie die Verteilung der Konfidenzintervalle  $\Delta A_0$  im eingebetteten Diagramm zu sehen.

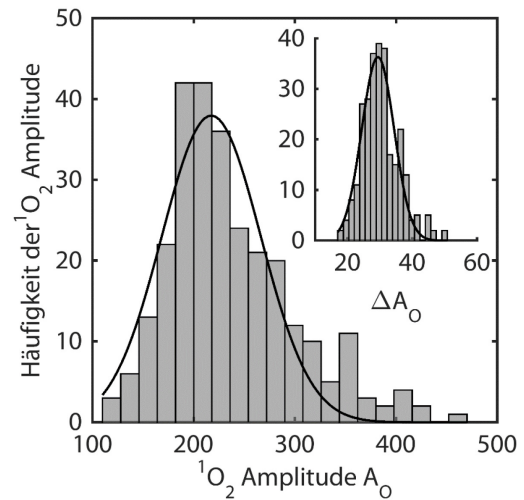


Abbildung 32: Verteilung der  $^1\text{O}_2$  Amplituden des TMPyP-PCL Scans mit daraus ermittelter Verteilungsfunktion (gaussförmig). Das eingebettete Diagramm zeigt die Verteilung der Konfidenzintervalle der  $^1\text{O}_2$  Amplitude mit entsprechender Verteilungsfunktion.

Um die Verteilung der mittleren quadratischen Differenzen der einzelnen Parameter zu den Nachbarpixeln zu ermitteln, wurde für jeden Pixel und jeden der drei Parameter die mittlere quadratische Differenz berechnet, wie in Formel (6) beispielhaft für die  $^1\text{O}_2$  Amplitude gezeigt ist.

$$\langle \Delta A_{0,\text{Nachbarn}} \rangle_{\text{Pixel}} = \frac{1}{N_{\text{Nachbarn}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{Nachbarn}}} \sqrt{(A_{0,\text{Pixel}} - A_{0,\text{Nachbarn } i})^2} \quad (6)$$

Dabei ist  $N_{\text{Nachbarn}}$  die Anzahl der Nachbarpixel ( $N_{\text{Nachbarn}}=8$ , am Rand und den Ecken der gescannten Fläche entsprechend weniger),  $A_{0,\text{Pixel}}$  die  $^1\text{O}_2$  Amplitude des jeweiligen Pixels und  $A_{0,\text{Nachbarn } i}$  die  $^1\text{O}_2$  Amplitude des Nachbarn  $i$ . Auch die Verteilung der mittleren quadratischen Differenzen wurde ermittelt und durch eine Gauss-Verteilung angefitet.

Abbildung 33 zeigt die so ermittelten Verteilungsfunktionen für die drei betrachteten Parameter. Die Verteilungsfunktion der mittleren quadratischen Differenz zu den „Nachbar“ Pixeln ist für alle drei Parameter breiter als die Verteilungsfunktion der Konfidenzintervalle. Die Zentren der Verteilungen, also das Maximum der Verteilungsfunktion, ist aber für die drei betrachteten Parameter nahezu gleich.

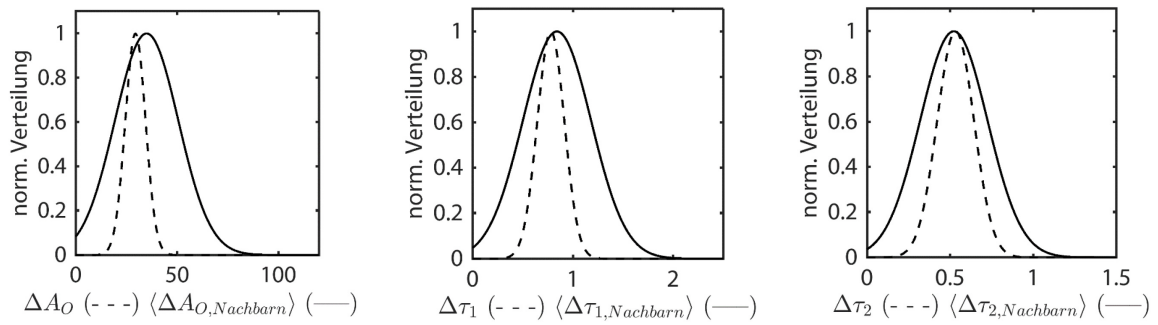


Abbildung 33: Vergleich der normierten Verteilungen der Konfidenzintervalle und der mittleren quadratischen Differenz der „Nachbar“ Pixel für die  $^1\text{O}_2$  Amplitude  $A_0$  (links),  $\tau_1$  (mitte) und  $\tau_2$  (rechts).

Also liegt die statistische Schwankung der Parameter zwischen einzelnen Pixeln bei einer nahezu homogenen Probe in der gleichen Größenordnung wie die Konfidenzintervalle der aus dem Fit bestimmten Parameter.

### 3.2.5 Vergleich zwischen 600 $\mu\text{m}$ und 2000 $\mu\text{m}$ Detektionsfaser

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, stehen zur Messung zwei verschiedene Detektionsfasern zur Verfügung. Eine 600  $\mu\text{m}$  Faser (F600) für Messungen, bei denen eine hohe laterale Auflösung gefragt ist und eine 2000  $\mu\text{m}$  Faser (F2000) für Messungen, bei denen eine hohe Signalintensität gefragt ist. Bei Messungen mit F600 wird eine angeregte Probenfläche mit einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  auf die Detektionsfaser abgebildet. Bei Messungen mit F2000 wird eine Probenoberfläche mit einem Durchmesser von 300  $\mu\text{m}$  auf die Anregungsfaser abgebildet. Wenn durch die Streueigenschaften der Probe davon ausgegangen werden kann, dass die gesamte abgebildete Probenfläche bei Messungen mit F2000 auch angeregt ist, sollte entsprechend

$$\frac{\pi \left( \frac{2000 \mu\text{m}}{2} \right)^2}{\pi \left( \frac{600 \mu\text{m}}{2} \right)^2} \approx 11$$

eine 11-fach höhere Signalintensität zu erwarten sein. Um die Signalintensitäten der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zwischen Messungen mit F600 und F2000 vergleichen zu können, wurde der oben beschriebene Scan auf der Oberfläche der TMPyP-PCL Probe mit beiden Fasern durchgeführt. Die Verteilung der aus den Fits gewonnenen  $^1\text{O}_2$  Amplituden wurde wie oben beschrieben ermittelt. Abbildung 34 zeigt beide Verteilungen.

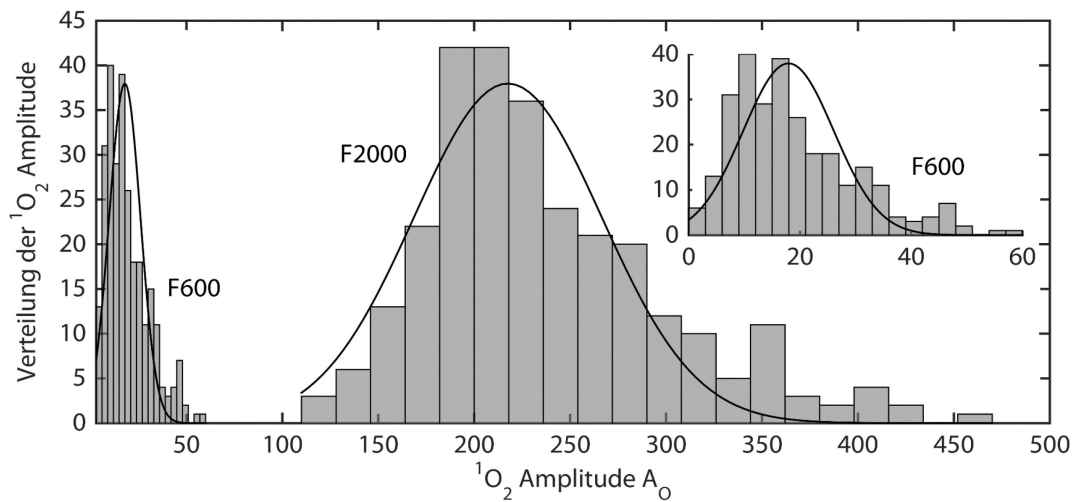


Abbildung 34: Verteilungen der  $^1\text{O}_2$  Amplitude zweier bis auf die Detektionsfaser identischer Scans der TMPyP-PCL Probe. Mit der 2000  $\mu\text{m}$  Detektionsfaser (F2000) wird eine etwa 11fach höhere  $^1\text{O}_2$  Amplitude erwartet im Vergleich zur 600  $\mu\text{m}$  Detektionsfaser (F600).

Eine konservative Abschätzung zeigt bereits, dass eine etwa 11fach höhere  $^1\text{O}_2$  Amplitude ermittelt werden konnte. Ein Vergleich der Zentren der ermittelten Gaußverteilungen für die  $^1\text{O}_2$  Amplituden der Scans mit F2000 und F600 zeigt sogar eine 14fach höhere  $^1\text{O}_2$  Amplitude.

### 3.3 Auswertung und Interpretation der Messdaten

In den vorherigen Abschnitten wurden bereits mehrere zeitaufgelöste NIR Lumineszenzsignale gezeigt, deren Kinetik der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik, aber auch komplexerer Kinetik entspricht. Auch die angepassten Kinetikmodelle zu diesen Signalen wurden gezeigt, und die daraus gewonnenen Parameter zu verschiedenen Vergleichen verwendet. Im Folgenden werden die Modellierung einer Kinetik und die numerische Anpassung des Modells an ein detektiertes Signal vorgestellt. Danach werden einige Probleme diskutiert, die sich bei der Auswertung der Messungen des hier beschriebenen Messplatzes ergeben.

#### 3.3.1 Modellierung und Anpassung komplexer Lumineszenzkinetik

Im Verlauf dieser Arbeit werden NIR Lumineszenzen mit sehr komplexer Kinetik detektiert. Neben der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik wurde Photosensibilisator-Phosphoreszenzkinetik und andere Störkinetik detektiert. Aus diesem Grund wurde ein allgemeiner Ansatz in Matrixschreibweise

gewählt um komplexe Kinetik zu modellieren und das Modell numerisch an die Messdaten anzupassen.

Gewählt wurde ein Mehr-Kompartiment-Modell [143,144]. Dieses Modell beschreibt allgemein ein System als eine begrenzte Anzahl von Kompartimenten, also in sich homogenen Subsystemen, die miteinander interagieren können. Im Folgenden wird beispielhaft vorgestellt, wie das verwendete Mehr-Kompartiment-Modell für die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik eines Photosensibilisators in homogener Umgebung, wie sie in Abschnitt 2.2.2 durch ein Ratengleichungssystem hergeleitet ist, angewendet wird. Dabei werden die Möglichkeiten der Erweiterung zur Beschreibung komplexer NIR Lumineszenzkinetik erklärt. Die hier vorgestellte Modellierung ist eine konkrete Anwendung des von van Stokkum et al. in [144] allgemein beschriebenen sequentiellen Kompartiment Modells.

Das Modell besteht aus zwei Kompartimenten: dem Photosensibilisator und dem Singulett-sauerstoff. Die Kinetik des Systems lässt sich durch

$$\frac{d}{dt}c(t) = \mathbf{K}_{II} \cdot c(t)$$

mit dem Vektor der Konzentrationen

$$c(t) = \begin{bmatrix} [^3\text{PS}^*](t) \\ [^1\text{O}_2](t) \end{bmatrix} \equiv \begin{bmatrix} c_T(t) \\ c_\Delta(t) \end{bmatrix}$$

und der Transfermatrix

$$\mathbf{K}_{II} = \begin{bmatrix} -k_T & 0 \\ \Phi_{^3\text{PS} \rightarrow ^1\text{O}_2} k_T & -k_\Delta \end{bmatrix}$$

beschreiben.  $\Phi_{^3\text{PS} \rightarrow ^1\text{O}_2}$  ist dabei die Effizienz des Energietransfers und wird hier auf den Wert 1 gesetzt. Die allgemeine Lösung dieser Gleichung ist:

$$c(t) = e^{\mathbf{K}_{II}t}$$

Um eine konkrete Lösung zu gewinnen wird das Problem zunächst als linear unabhängiger Prozess betrachtet. Danach wird das parallele Modell in ein sequentielles Modell umgewandelt.

Die Lösung für die Differentialgleichung des parallelen Modells wird mit

$$\mathbf{K}_I = \text{diag}(\mathbf{K}_{II}) = \begin{bmatrix} -k_T & 0 \\ 0 & -k_\Delta \end{bmatrix}$$

gewonnen:



$$c(t) = C_I = \begin{bmatrix} e^{-k_T t} \\ e^{-k_\Delta t} \end{bmatrix}$$

Für die Betrachtung des sequentiellen Modells ist eine Eigenvektor-Eigenwert Zerlegung der Form

$$K_{II} = U K_I U^{-1}$$

notwendig um die Lösung

$$c(t) = C_{II} = U \text{diag}(U^{-1} N_c^T) \times \begin{bmatrix} e^{-k_T t} & e^{-k_\Delta t} \end{bmatrix}^T \equiv A_{II}^T C_I^T$$

$$C_{II} = C_I A_{II}$$

zu erhalten. Die Matrix  $A_{II}$  sieht in diesem Beispiel folgendermaßen aus:

$$A_{II} = \begin{bmatrix} 1 & -\frac{\Phi_{3PS \rightarrow ^1O_2} k_T}{k_T - k_\Delta} \\ 0 & \frac{\Phi_{3PS \rightarrow ^1O_2} k_T}{k_T - k_\Delta} \end{bmatrix}$$

$N_c$  ist dabei ein Vektor, der bei der Beschreibung von NIR Lumineszenzkinetik die Anfangsbedingungen repräsentiert. In diesem Beispiel ist  $N_c = \begin{bmatrix} 1 & 0 \end{bmatrix}$ .

Damit erhält man als Ergebnis:

$$c(t) = \begin{bmatrix} e^{-k_T t} \\ e^{-k_\Delta t} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} c_T(t=0) & -\frac{c_{3PS}(t=0) \cdot \Phi_{3PS \rightarrow ^1O_2} k_T}{k_T - k_\Delta} \\ 0 & \frac{c_{3PS}(t=0) \cdot \Phi_{3PS \rightarrow ^1O_2} k_T}{k_T - k_\Delta} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_T(t=0) e^{-k_T t} \\ \frac{c_T(t=0) \cdot \Phi_{3PS \rightarrow ^1O_2} k_T}{k_T - k_\Delta} (e^{-k_\Delta t} - e^{-k_T t}) \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} c_T(t) \\ c_\Delta(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} c_T(t=0) e^{-k_T t} \\ \frac{c_T(t=0) \cdot \Phi_{3PS \rightarrow ^1O_2} k_T}{k_T - k_\Delta} (e^{-k_\Delta t} - e^{-k_T t}) \end{bmatrix}$$

Ein Vergleich von  $c_\Delta(t)$  mit Formel (2) zeigt, dass beide Betrachtungen zum gleichen Ergebnis führen. Dieses Ergebnis kann zur Analyse von gemessenen  $^1O_2$  Lumineszenzsignalen verwendet werden, indem eine Fitfunktion der Form

$$f(t) = A \cdot c(t) + O$$

$$= \begin{bmatrix} A_{Phos} & A_O \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e^{-k_T t} \\ \frac{k_T}{k_T - k_\Delta} (e^{-k_\Delta t} - e^{-k_T t}) \end{bmatrix} + O$$

$$= A_{Phos} e^{-k_T t} + A_O \frac{k_T}{k_T - k_\Delta} (e^{-k_\Delta t} - e^{-k_T t}) + O$$

mit dem Vektor der Amplituden  $A$  verwendet wird. Diese Funktion entspricht Formel (5). Bei der Anpassung des Kinetikmodells an eine zeitaufgelöst gemessene NIR Lumineszenz kann eine Phosphoreszenz des Photosensibilisators ausgeschlossen werden, indem  $A_{Phos} = 0$  fixiert wird.

Der Vorteil dieser auf den ersten Blick recht aufwendigen Betrachtung der Kinetik ist, dass die numerische Umsetzung simpel zu realisieren ist und die numerische Modellierung beinahe beliebiger Systeme ohne Lösung einer Differentialgleichung möglich ist. In der hier verwendeten, in MATLAB geschriebenen Implementierung werden Anzahl der Kompartimente  $N$ , die Anfangsbedingungen  $N_c$ , die Übergangseffizienzen  $\Phi$  in Form eines Vektors und die Lösungen des parallelen Modells  $C_i$  angegeben. Für  $C_i$  stehen drei Kinetikmodelle zur Auswahl: eine mono-exponentielle Funktion, eine Kohlrausch Funktion [108], wie sie bereits in Abschnitt 2.2.4 beschrieben ist und eine Becquerel Funktion [145]. Die Becquerel Funktion ist eine weitere, rein empirische Funktion zur Beschreibung von Lumineszenzkinetik mit Ratenkonstanten, die einer Verteilung unterliegen. Sie findet aber hier keine Anwendung und wird deshalb nicht weiter diskutiert.

Im Folgenden wird mehrfach NIR Lumineszenzkinetik als Überlagerung einer  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik und eines Störsignals beschrieben. Oftmals wird das Störsignal durch eine Kohlrausch Funktion beschrieben. Die entsprechenden Parameter für die hier verwendete Implementierung sind dann:

$$\begin{aligned}
 N &= 3 \\
 N_c &= [1 \quad 0 \quad 1] \\
 \Phi &= [\Phi_{1 \rightarrow 2} \quad \Phi_{1 \rightarrow 3} \quad \Phi_{2 \rightarrow 3}] = [1 \quad 0 \quad 0] \\
 C_i &= \begin{bmatrix} e^{-k_1 t} & e^{-k_2 t} & e^{-(k_3 t)^{\beta_3}} \end{bmatrix}
 \end{aligned}$$

Um das Kinetikmodell numerisch an die gemessene NIR Lumineszenz anzupassen wurde ein Algorithmus für nichtlineare *Least-Square* Probleme<sup>4</sup> verwendet. Die Differenz zwischen der Modellfunktion und dem NIR Lumineszenzsignal wird dabei gemäß [113,146,147] gewichtet. Die 95%-Konfidenzintervalle der durch den Fit bestimmten Parameter wurden durch eine entsprechende Funktion<sup>5</sup> bestimmt.

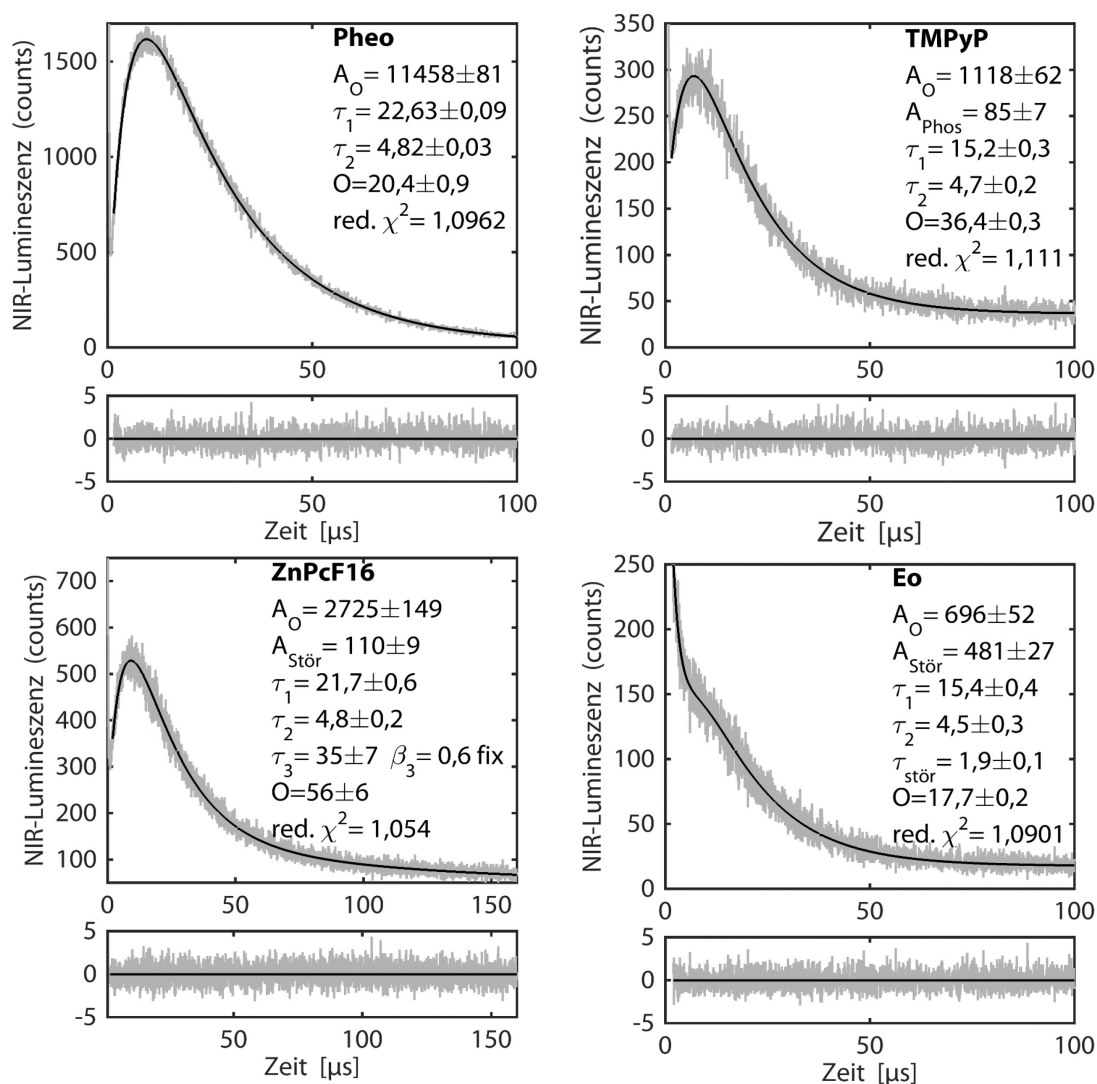


Abbildung 35: Analyse der NIR Lumineszenzkinetik der vier in Abschnitt 0 vorgestellten PCL Proben. Für Pheo und TMPyP genügt ein Modell mit 2 Kompartimenten um die gemessene Lumineszenz zufriedenstellend zu beschreiben. Bei ZnPcF16 und Eo tauchen Störsignale auf, sodass ein Modell mit 3 Kompartimenten notwendig ist.

<sup>4</sup> Verwendet wurde die Funktion *lsqnonlin* der *Optimization Toolbox* in Matlab

<sup>5</sup> *nlparci* aus der *Optimization Toolbox* in Matlab

Um einen Eindruck von der Aussagekraft der Kinetikparameter zu bekommen, die aus einer komplexen NIR Lumineszenzkinetik bestimmt wurden, sind in Abbildung 35 die angepassten Modelle für die vier in Abschnitt 3.2 vorgestellten Messungen an PCL Proben gezeigt. Für die Pheo-PCL und TMPyP-PCL Proben genügt ein Zwei-Kompartiment-Modell um die Kinetik der gemessenen NIR Lumineszenz zu beschreiben, auch wenn ein nicht vernachlässigbarer Photosensibilisator Phosphoreszenzanteil in der NIR Lumineszenzkinetik zu finden ist, die auf TMPyP-PCL gemessen wurde. Dieser Phosphoreszenzanteil ist in nahezu allen NIR Lumineszenzsignalen zu finden, wenn TMPyP als Photosensibilisator dient. Die Phosphoreszenz Amplitude entspricht dabei etwa  $(10 \pm 5) \%$  der  $^1\text{O}_2$  Amplitude.

Für die NIR Lumineszenz, die auf den Oberflächen von ZnPcF16-PCL und Eo-PCL gemessen wurde, ist ein Drei-Kompartiment-Modell notwendig um die Lumineszenzkinetik zufriedenstellend zu beschreiben. Das dritte Kompartiment entspricht einer NIR Lumineszenz unbekannter Herkunft. NIR Lumineszenz, die nicht eindeutig als  $^1\text{O}_2$ -Lumineszenz oder Photosensibilisator-Phosphoreszenz identifiziert werden kann, wird im Folgenden Störkinetik genannt.

Im Fall von Eo-PCL kann die Störkinetik monoexponentiell beschrieben werden. Im Fall von ZnPcF16-PCL ist eine Kohlrauschfunktion mit  $\beta=0,6$  notwendig. Um den Einfluss dieser Störkinetik, aber auch der Photosensibilisator Phosphoreszenz im Fall von TMPyP-PCL zu visualisieren sind in Abbildung 36 die NIR Lumineszenzsignale, die NIR Lumineszenzkinetik und ihre

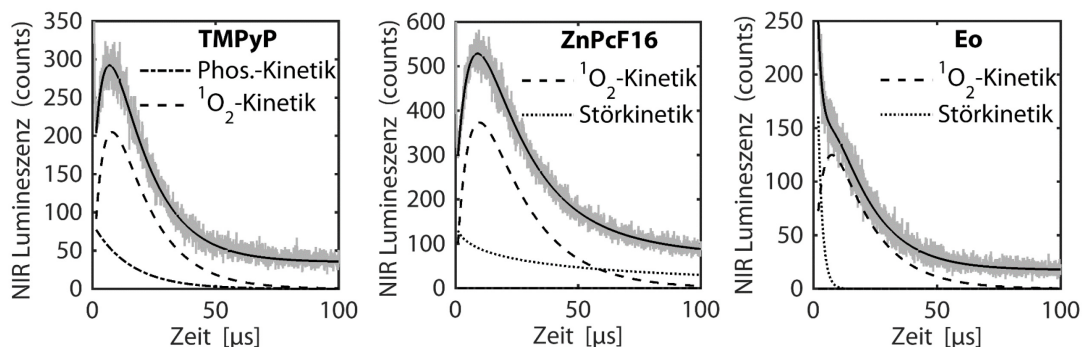


Abbildung 36: Zerlegung der NIR Lumineszenzkinetik in  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik und Störkinetik, gemessen auf der Oberfläche von TMPyP-PCL, ZnPcF16-PCL und Eo-PCL.

Einzelkomponenten zu sehen.

Bei der Betrachtung der ermittelten Parameter für die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik (Abbildung 35) fällt auf, dass  $\tau_2$  für die NIR Lumineszenzkinetik alle Proben innerhalb ihrer Konfidenzintervalle gleich ist. Es kann also angenommen werden, dass es sich bei  $\tau_2$  um die Lebensdauer von  $^1\text{O}_2$  in PCL

handelt, während die längere Zeit,  $\tau_1$ , die Triplettlebensdauer des jeweiligen Photosensibilisators repräsentiert.

Die Konfidenzintervalle der Zeiten der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik liegen für TMPyP-PCL, ZnPcF16-PCL und Eo-PCL in nahezu gleich, obwohl Unterschiede in der Amplitude und dem Signal-Rausch-Verhältnis zu sehen sind. Die Konfidenzintervalle der Zeiten der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik, die auf Pheo-PCL gemessen wurden, sind im Vergleich dazu um eine Größenordnung niedriger. Die Gründe dafür liegen in dem besseren Signal-Rausch-Verhältnis und einer Kinetik mit weniger freien Parametern. Anzumerken ist noch, dass bei der Anpassung der auf ZnPcF16-PCL gemessenen NIR-Lumineszenzkinetik eine Fixierung des Parameters  $\beta$  notwendig war. Wenn  $\beta$  ein freier Parameter bleibt, führt die Anpassung zwar zu sehr ähnlichen Werten, die Konfidenzintervalle der Parameter steigen aber um Größenordnungen.

Der Fit der NIR Lumineszenzkinetik der EO-PCL Probe verdeutlicht, dass auch dann eine Anklingzeit ermittelt werden kann, wenn ein Störsignal das Anklingen der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik deutlich überlagert. Auch wenn alle Anklingzeiten innerhalb ihrer Konfidenzintervalle übereinstimmen, ist jedoch für EO-PCL die größte Abweichung der Anklingzeit zu beobachten.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die Unterscheidung einzelner Komponenten einer Lumineszenzkinetik nur bedingt möglich ist. Selbst bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen, bei denen das Signal-Rausch-Verhältnis Größenordnungen über dem von zeitaufgelösten NIR Lumineszenzmessungen liegt, ist eine Unterscheidung von zwei monoexponentiellen Komponenten mit ähnlicher Abklingzeit nicht möglich [113,148,149]. Aus diesem Grund muss das Konfidenzintervall der Parameter aus dem Anpassungsalgorithmus als untere Grenze des Vertrauensbereichs angesehen werden. Insbesondere wenn die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik von Störsignalen überlagert wird, ist das „reale“ Vertrauensintervall wohl um ein Vielfaches größer. Die ermittelte An- und Abklingzeit ist bei komplexer Kinetik deshalb generell sehr konservativ zu interpretieren.

### **3.3.2 Auswertung von 2D-Scans**

Im vorherigen Abschnitt wurde erläutert, wie die NIR Lumineszenzkinetik modelliert und an ein NIR Lumineszenzsignal angepasst werden kann. Im Folgenden wird diskutiert, wie die NIR Lumineszenzkinetik eines 2D Scans ausgewertet und interpretiert werden können.

In dieser Arbeit beschränkt sich die Auswertung der NIR Lumineszenz-Scans darauf, dass jeder Pixel einzeln ausgewertet wird, indem ein passendes, aber trotzdem möglichst einfaches Kinetikmodell an die gemessene Lumineszenz angepasst wird. Je nach Größe des Scanbereichs und gewählter

Schrittweite muss daher mitunter die NIR Lumineszenzkinetik mehrerer Tausend Pixel angefitet werden. Eine manuelle Kontrolle der Qualität eines jeden Fits ist deshalb nur bei einer Stichprobe möglich. Aus diesem Grund müssen zunächst folgende Voraussetzung an das Kinetikmodell und die Fitroutine gewährleistet werden:

- Passendes Kinetikmodell mit möglichst wenig freien Parametern
- Sinnvolle, auf einander abgestimmte Parametergrenzen für die freien Parameter
- Passende Startwerte

Wenn diese Voraussetzungen umgesetzt sind, können einzelne Kinetikparameter in Form von Intensitätsplots bildlich dargestellt werden. Im Verlauf dieser Arbeit werden vor allem die Fluoreszenzintensität und die  $^1\text{O}_2$  Amplitude bildlich dargestellt und mit Fotos der Probe verglichen.

Wenn die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik verschiedener Proben verglichen wird, ist es für den Vergleich mit anderen Proben sinnvoll, dass pro Probe ein Mittelwert für die  $^1\text{O}_2$  Amplitude, die Anklingzeit und die Abklingzeit ermittelt wird.

Wenn ein  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Scan über eine Oberfläche mit verschiedenen Proben oder verschiedenen Bereichen von Interesse durchgeführt wurde, muss zunächst der Scan in verschiedene Scanbereiche aufgeteilt werden. Dieser Vorgang wird in Abschnitt 0 noch an einem Beispiel erläutert. Wenn die verschiedenen Bereiche isoliert sind, gibt es verschiedene Methoden der Mittelung. Im Folgenden werden mehrere Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen vorgestellt und erläutert, unter welchen Umständen in dieser Arbeit welche Methode gewählt wurde.

Eine Möglichkeit um verschiedene Bereiche miteinander zu vergleichen ist die Betrachtung des jeweiligen Pixels mit der maximalen  $^1\text{O}_2$  Amplitude. Dieser Methode hat den Vorteil, dass die NIR Lumineszenzkinetik von Lumineszenzsignalen ohne eine Mittelung oder Summierung miteinander verglichen werden. Der Nachteil dieser Methode ist wiederum, dass mitunter starke Schwankungen zwischen den Pixeln eines Bereichs vernachlässigt werden. Zudem kommt es zu „Ausreißern“, also Pixel, an denen eine deutlich stärkere NIR Lumineszenz detektiert wird als an allen anderen des Bereichs. Beim Vergleich der Pixel der maximalen  $^1\text{O}_2$  Amplitude können solche Ausreißer zu deutlichen Fehlinterpretationen führen.

Um Schwankungen zwischen Pixeln eines Bereichs zu egalisieren kann die detektierten NIR Lumineszenzkinetik mehrerer Pixel summiert werden. Abhängig von der Anzahl der Pixel, wird eine NIR Lumineszenzkinetik erhalten, die ein deutlich höheres Signal-Rausch-Verhältnis aufweist als die Lumineszenzkinetik eines einzelnen Pixels. Der Nachteil ist, dass die aufsummierte Kinetik mit

steigender Anzahl an Pixeln deutlich komplexer wird. Dieses Phänomen ist in Abbildung 37 gezeigt. Gezeigt ist die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik, die auf der Oberfläche der TMPyP-PCL Probe detektiert wurde. Der entsprechende Scan ist in Abbildung 31 in Abschnitt 3.2.4 gezeigt. Oben links ist die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und der Fit des entsprechenden Kinetikmodells des Pixels mit der größten  $^1\text{O}_2$  Amplitude gezeigt, oben rechts ist Summe über 10 Pixel, unten links die Summe über 100 Pixel und unten rechts die Summe über alle 279 Pixel dargestellt. Zu sehen ist, dass das Signal-Rausch-Verhältnis mit steigender Anzahl summierter Pixel deutlich besser wird. Die Konfidenzintervalle der An- und Abklingzeit werden deutlich kleiner. Auch das Konfidenzintervall der  $^1\text{O}_2$  Amplitude relativ zum Wert wird kleiner.

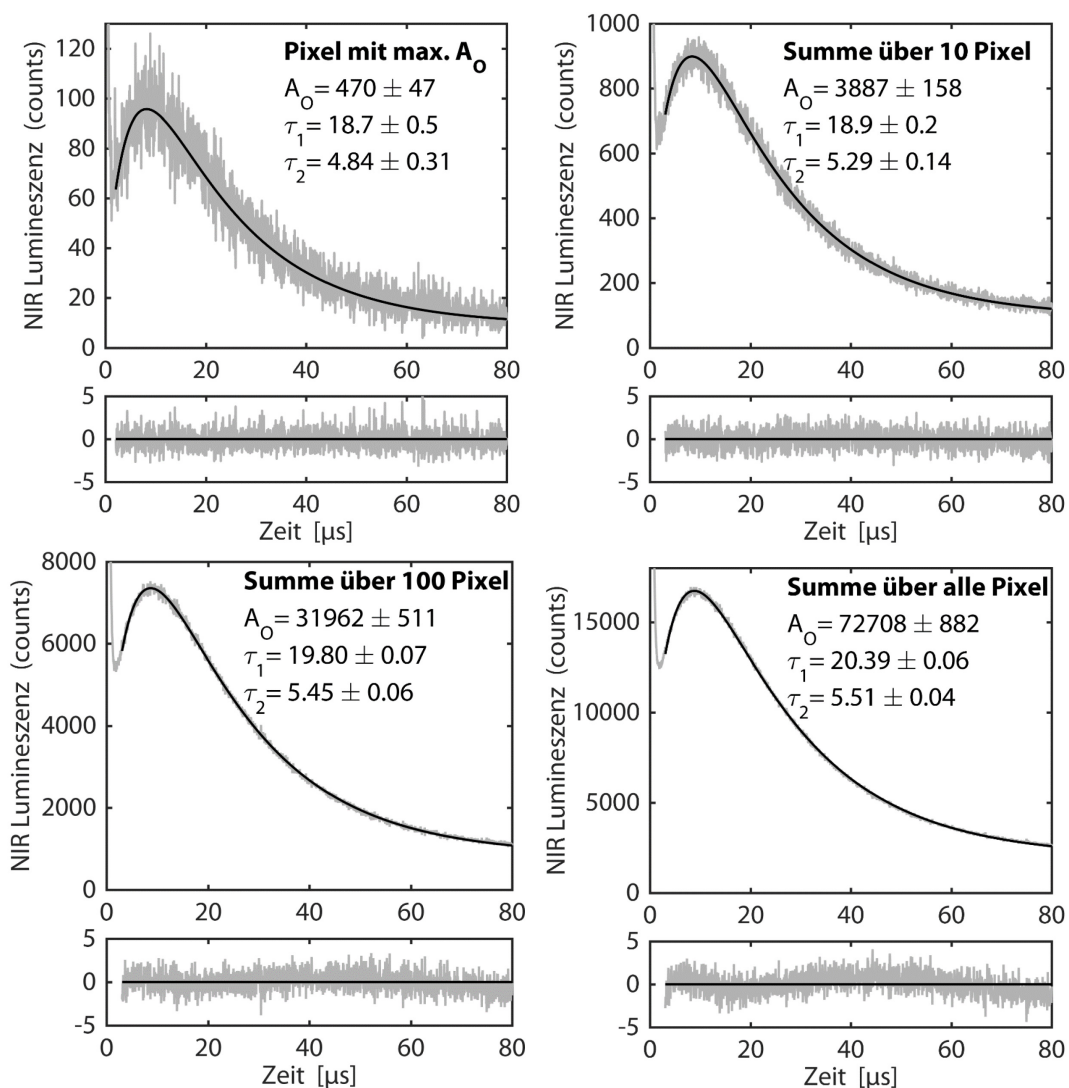


Abbildung 37: Vergleich der Fitqualität für einen Pixel (oben links), die Summe über 10 Pixel (oben rechts), die Summe über 100 Pixel (unten links) und die Summe über alle (279) Pixel (unten rechts). Das Signal-Rausch-Verhältnis wird mit steigender Pixelzahl größer, die Qualität des Fits wird jedoch schlechter, wie die Residuen zeigen.

Allerdings zeigen die Residuen deutliche Abweichungen der aufsummierten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik vom verwendeten Kinetikmodell. Für dieses Phänomen gibt es zwei vorstellbare Ursachen:

1. Durch das höhere Signal-Rausch-Verhältnis wird deutlich, dass die NIR Lumineszenzkinetik komplexer ist als das verwendete Modell
2. Auch wenn die Kinetik der einzelnen Datensätze, über die summiert wird, durch ein biexponentielles Kinetikmodell beschrieben werden kann, ist die Kinetik der Summe aller Datensätze nicht mehr durch ein solches Modell zu beschreiben, wenn die Kinetikparameter der einzelnen Datensätze sich geringfügig unterscheiden.

Aus diesem Grund muss bei dieser Methode die Anzahl der Pixel, über die summiert wird, individuell gewählt werden. Die Anzahl muss so gewählt sein, dass ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wird, das verwendete Kinetikmodell aber noch mit guter Fitqualität an die Daten angepasst werden kann.

Nachdem die Anzahl der Pixel festgelegt ist, muss entschieden werden über welche Pixel summiert werden soll. Dabei bieten sich zwei Möglichkeiten an: die Summation über die Pixel mit dem höchsten Signal-Rausch-Verhältnis oder die Summation über räumlich immer gleiche Pixel. Insbesondere bei Proben mit inhomogen verteilter  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz ist die Bestimmung einer sinnvollen Anzahl an Pixeln, über die summiert wird, oder die Wahl über welche Pixel summiert werden sollte, sehr schwer.

In solchen Fällen macht eine Betrachtung von Mittelwerten Sinn. Also beispielsweise dem Mittelwert aller Anklingzeiten, die in einem Bereich ermittelt wurden. Bei der Betrachtung von ungewichteten Mittelwerten der  $^1\text{O}_2$  Amplitude, der An- oder der Abklingzeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik wird die Signalstärke der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz allerdings nicht berücksichtigt. Die Werte, die an einem Pixel mit sehr geringem Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt wurden, erhalten die gleiche Gewichtung wie die Werte, die an dem Pixel mit dem größten Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt wurden. Da das Signal-Rausch-Verhältnis zu den Konfidenzintervallen der errechneten Parameter korreliert ist, bietet sich hier die Betrachtung von fehlergewichteten Mittelwerten der Form

$$\bar{x} = \frac{\sum \frac{x_i}{(\Delta x_i)^2}}{\sum \frac{1}{(\Delta x_i)^2}}$$



an. Dabei ist  $x_i$  der gefittete Wert und  $\Delta x_i$  die Grenze des Konfidenzintervalls. Die Grenze des Vertrauensbereichs entspricht gemäß [150]:

$$\Delta \bar{x} = \sqrt{\frac{1}{\sum \left( \frac{1}{\Delta x_i} \right)^2}}$$

Die fehlergewichteten Mittelwerte und ihre Vertrauensbereiche der  $^1\text{O}_2$  Amplitude, An- und Abklingzeit für den oben angeführten Scan der TMPyP-PCL Probe sind:

$$\begin{aligned} A_0 &= 218 \pm 2 \\ \tau_1 &= 20,04 \pm 0,04 \mu\text{s} \\ \tau_2 &= 5,73 \pm 0,03 \mu\text{s} \end{aligned}$$

Wenn man diese Werte mit denen der Fits in Abbildung 37 vergleicht fällt auf, dass An- und Abklingzeit innerhalb der Vertrauensbereiche mit denen des Fits der Gesamtsumme übereinstimmt.

Die Auswahl der Methode zur Auswertung ist im weiteren Verlauf dieser Arbeit gemäß folgenden Kriterien erfolgt:

- Bei stark inhomogener und wenig strukturierter Verteilung der Lumineszenz wurden die fehlergewichteten Mittelwerte aller Pixel betrachtet
- Bei strukturierter Verteilung der Lumineszenz, oder deutlicher Lokalisation der Lumineszenz in einem Bereich wurde über mehrere Pixel summiert. Dabei wurde die Anzahl der Pixel so gewählt, dass sie möglichst hoch ist, das Kinetikmodell aber noch gut an die NIR Kinetik angepasst werden kann.

Im Folgenden wird das Konfidenzintervall, oder der Vertrauensbereich des fehlergewichteten Mittelwerts eines Kinetikparameters immer mit angegeben. Diese Angaben sollten aber nicht mit dem Fehler des Parameters verwechselt werden. Das Konfidenzintervall entspricht dem statistischen Fehler der Messung, er berücksichtigt aber nur bedingt die Variabilität durch die Inhomogenität der Probe. Auch die Probe-Probe-Variabilität wird nicht berücksichtigt, dabei ist sie bei biologischen Proben erfahrungsgemäß der dominante Einfluss. Bei der Auswertung von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Scans an biologischen Proben kann der reale Fehler nur aus der Statistik über viele gleiche Proben geschätzt werden. Die hier angegebenen Unsicherheiten sind lediglich als Untergrenze der möglichen Fehler anzusehen. Sie werden trotzdem mit angegeben, weil sie mit dem Signal-Rausch-Verhältnis korreliert sind.

### 3.4 Detektion von photosensibilisiert generiertem Singulett-sauerstoff auf Nährböden

Ein Ziel dieser Arbeit ist, ein Werkzeug zu schaffen, mit dem die Untersuchung der Lumineszenz von photosensibilisiert generiertem  $^1\text{O}_2$  auf Oberflächen und der Einfluss von verschiedenen Mikroorganismen, die auf Oberflächen wachsen, möglich ist.

Die Messung an mikrobiologischen Organismen ist mit vielen Herausforderungen verbunden. Um den Einfluss von Photosensibilisatoren auf Mikroorganismen zu untersuchen müssen Bedingungen geschaffen werden, in denen die Mikroorganismen lebensfähig sind. Gleichzeitig müssen wiederholte Messungen an der Oberfläche der Probe möglich sein.

Seit der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts ist die Verwendung von Agarplatten als Nährböden für Mikroorganismen etabliert [151]. Agarplatten bestehen aus einem Nährmedium, dass mit Hilfe von Agar-Agar geliert wird. Meist werden runde Petrischalen aus Polystyrol mit einem Durchmesser von 92 mm und einer Höhe von 15 mm als Behälter verwendet. Der jeweilige Mikroorganismus wird auf den Nährboden geimpft und wächst auf der Oberfläche.

Da diese Form der Kultivierung von Mikroorganismen sehr verbreitet ist, wurde sie als Grundlage genommen und so abgeändert, dass regelmäßige, reproduzierbare Lumineszenzmessungen an der Oberfläche des Nährbodens möglich sind.

Erste Versuche zeigten, dass eine spezifische Diffusion eines jeden Photosensibilisators in den Agar stattfindet. Bei  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzmessungen führt diese Diffusion zu einer äußerst geringen lokalen Photosensibilisator Konzentration im Detektionsvolumen und damit zu einer sehr geringen Signalintensität. Dieser Effekt kann stark abgeschwächt werden, wenn ein Filterpapier auf die Oberfläche der Agarplatte gelegt wird, auf das der Photosensibilisator aufgebracht wird. Um diesen Effekt zu verdeutlichen wurden 5  $\mu\text{l}$  einer 1 mM TMPyP-

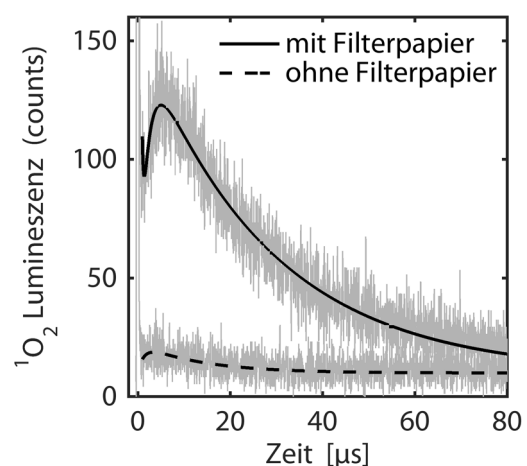


Abbildung 38: Vergleich der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz, generiert durch 5  $\mu\text{l}$  TMPyP (1 mM) gemessen auf der Oberfläche von BBM Agar, eine Stunde nach Probenpräparation. Die Messdauer betrug 10 s.

H<sub>2</sub>O Lösung auf eine BBM<sup>6</sup> Agarplatte mit und ohne Filterpapier (rund, Ø 5 mm) gegeben. Dabei wurden die 5 µl, die direkt auf die Oberfläche der Agarplatte gegeben wurden, so verteilt, dass sie die gleiche Fläche wie das Filterpapier einnehmen. Abbildung 38 zeigt die gemessene <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz eine Stunde nach der Probenpräparation. Die Amplitude der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik ist mit Filterpapier etwa 10fach höher. Im NIR zeigt Filterpapier ein marginales Störsignal, im VIS kommt es bei manchen Filterpapieren zu einer Lumineszenz zwischen 410 nm und 500 nm. Sowohl das Auftreten der Lumineszenz als auch ihre Intensität schwanken zwischen Filterpapieren. Da der spektrale Bereich dieser Lumineszenz aber nicht in Konflikt mit dem spektralen Bereich der Fluoreszenz der hier untersuchten Photosensibilisatoren steht, kann sie vernachlässigt werden. Filterpapier eignet sich dementsprechend sehr gut als inhärente Zwischenschicht. Aus diesem Grund werden im Folgenden Messungen auf Filterpapier gezeigt.

Ein weiterer Effekt, der beobachtet wurde, ist das Auftreten von komplexer NIR Lumineszenzkinetik. Im Folgenden wird diese komplexe Kinetik als Überlagerung einer biexponentiellen <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik mit einer als „Störsignal“ bezeichneten NIR Lumineszenzkinetik betrachtet. Auch wenn es im Folgenden nicht ausdrücklich erwähnt wird, ist dieses Störsignal auch bei Messungen bei 1230 nm messbar. Die Kinetik eines Störsignals unterscheidet sich zudem stark von der einer möglichen Photosensibilisator Phosphoreszenz. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass es sich weder um eine <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz noch um eine Photosensibilisator Phosphoreszenz handelt.

### **3.5 Einfluss von verschiedenen Nährmedien in Agarplatten auf das Singulett-Sauerstoff Lumineszenzsignal**

Um den Einfluss von Nährmedien in Agarplatten auf das <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzsignal zu untersuchen, wurden mehrere Testreihen durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine definierte Menge Photosensibilisator (5 µl einer 1 mM TMPyP-H<sub>2</sub>O Lösung) auf ein immer gleich großes Stück trockenes Filterpapier (Ø 5 mm) gegeben. Nachdem die Filterpapiere getrocknet waren, wurden sie auf Agarplatten mit folgenden, etablierten, in der Mikrobiologie oft verwendeten Nährmedien gelegt:

---

<sup>6</sup> Bold's Basal Medium

- **Bold's Basal Medium Agar (BBM Agar):** Ein Nährmedium das hauptsächlich zur Kultivierung von Algenkulturen verwendet wird. Es besteht aus einer Zusammensetzung verschiedener Salze.
- **Malzextrakt Agar (Malz Agar):** Ein Nährmedium mit hohem Feuchtegehalt, dass zur Kultivierung verschiedener Mikroorganismen (Schimmel- und Hefepilze, aber auch Bakterien) verwendet wird. Es besteht aus Malzextrakt, also einer Mischung verschiedener Zucker (hauptsächlich Maltose) und Aminosäuren.
- **Lysogeny Broth Medium Agar (LB Agar):** Ein Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien. Es besteht aus Hefeextrakt, Trypton und Natriumchlorid.
- **(H<sub>2</sub>O Agar:** Agarplatte ohne Nährmedium)

Nach einer Stunde wurde die <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz dann auf den verschiedenen Agarplatten und auf dem trockenen Filterpapier unter gleichen Bedingungen und mit gleichen Parametern (Messdauer pro Pixel 5 s, Kanalbreite 20 ns, 0.3 µJ Anregungsenergie) gemessen. Dafür wurde eine 10 x 10 mm große Fläche um das Filterpapier herum in 1 mm Schrittweite in x- und y- Richtung gescannt.

Abbildung 39 zeigt die auf den Oberflächen von trockenem Filterpapier (FP) und verschiedenen Agarplatten gemessenen NIR Lumineszenzsignale. Zu sehen ist die Summe des Signals der fünf Pixel mit stärkstem Signal. Auf den ersten Blick ist zu beobachten, dass die Signalintensität auf Agarplatten deutlich geringer ist als auf trockenem Filterpapier.

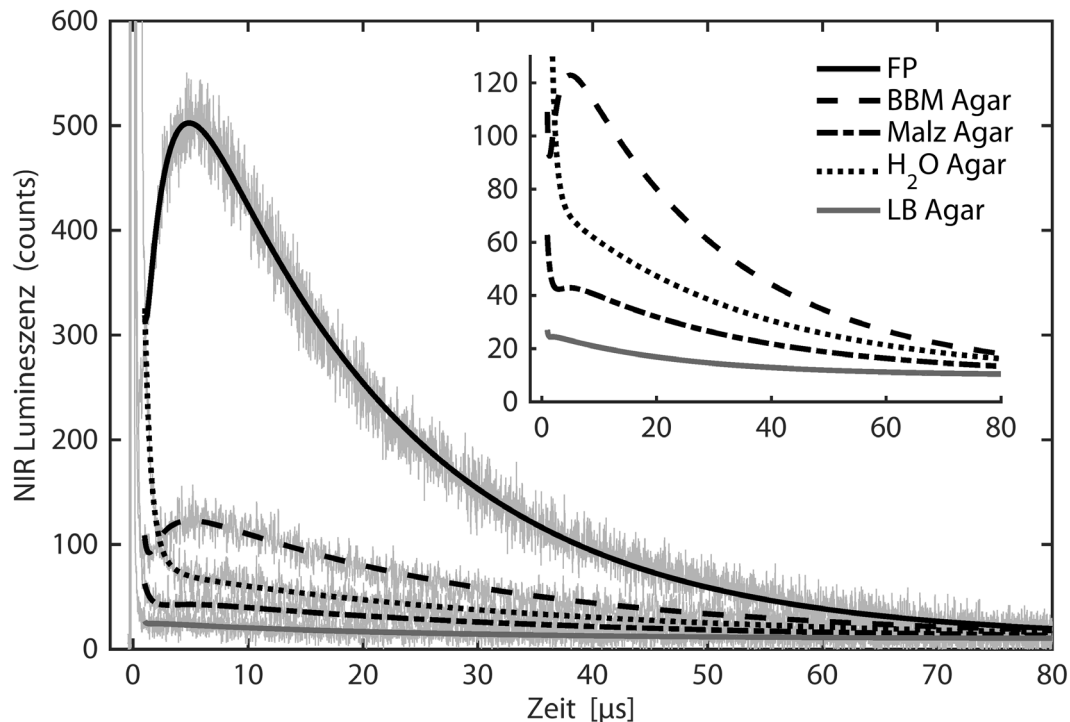


Abbildung 39: Vergleich der NIR Lumineszenz gemessen auf trockenem Filterpapier und Filterpapier auf verschiedenen Agarplatten. Im Vergleich zur NIR Lumineszenzkinetik auf trockenem Filterpapier zeigt die NIR Lumineszenzkinetik auf Agarplatten eine deutlich geringere Intensität, sowie deutlich komplexere Kinetik. Gezeigt ist die Summe des Signals von 5 Pixeln.

Der Vergleich der NIR Lumineszenzkinetik auf den Agarplatten mit verschiedenen Nährmedien zeigt, dass auf BBM Agar die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik mit dem höchsten Signal-Rausch-Verhältnis detektiert werden konnte. Auf H<sub>2</sub>O Agar, also der Agarplatte ohne Nährmedium, wurde zwar eine signifikante NIR Lumineszenz gemessen, allerdings ist die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik von einem Störsignal überlagert. Auf Malz Agar kann noch eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik bestimmt werden, wenn auch mit deutlich geringer Amplitude als auf BBM Agar, ein Störsignal ist aber deutlich erkennbar. Das geringste Signal wurde auf LB Agar gemessen, auch wenn eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik dennoch erkennbar ist.

Sowohl Agar als auch Nährmedien führen also zu einem Quenching der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz. Ein deutlicher Einfluss ist sicher der hohe Wasseranteil in Agar, die Unterschiede zwischen den verschiedenen Nährmedien zeigen allerdings, dass Wasser nicht die einzige Ursache für das Quenching ist.

Um weitere Ursachen für dieses Signal-Quenching zu identifizieren wurde eine Messreihe mit LB Medium durchgeführt, also dem Nährmedium, auf dem das geringste Signal detektiert wurde. Dafür wurden Agarplatten mit den drei Bestandteilen des LB-Medium in allen Kombinationen

hergestellt. Das NIR Lumineszenzsignal wurde unter gleichen Bedingungen auf allen Agarplatten gemessen. Die drei Bestandteile sind:

- 90Hefeextrakt – ein Konzentrat aus löslichen Inhaltstoffen von Hefezellen. Es besteht aus einer Mischung verschiedener Peptide, freier Aminosäuren und Vitaminen.
- Trypton – ein Gemisch verschiedener Peptide. Es wird durch enzymatische Verdauung von Proteinen hergestellt.
- Natriumchlorid – Kochsalz.

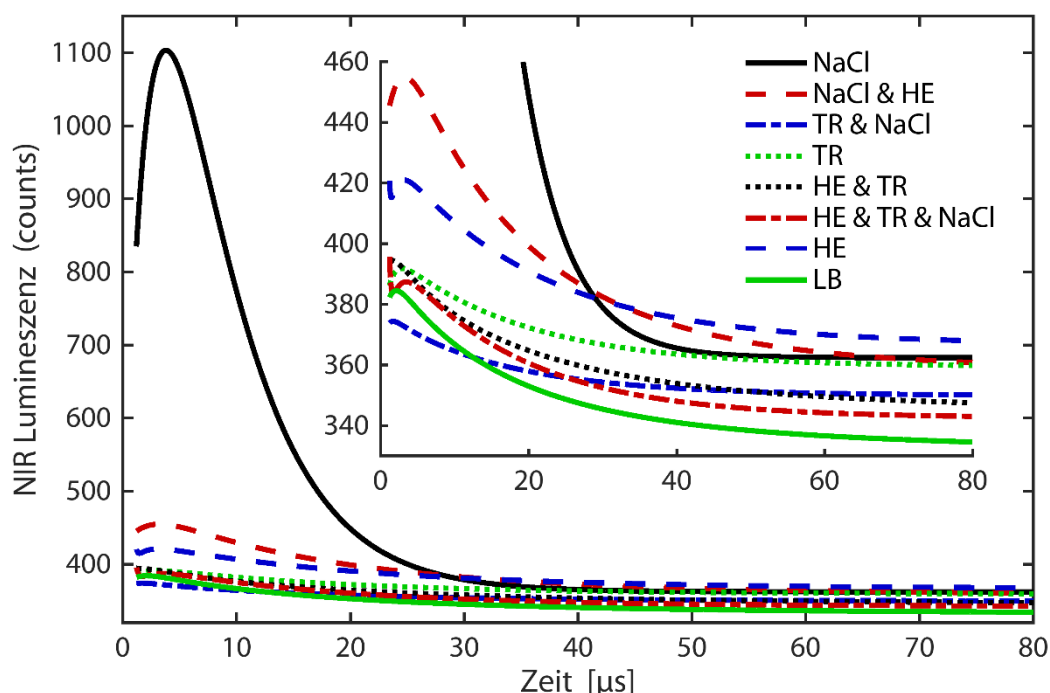


Abbildung 40: NIR Lumineszenzkinetik von TMPyP auf verschiedenen Agarplatten. Die Agarplatten enthalten die unterschiedlichen Bestandteile und Kombinationen von Bestandteilen des LB-Mediums. Gezeigt ist der Fit der Summe des Signals von 5 Pixeln. Zu sehen ist ein deutliches Quenching der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz durch Trypton (TR) und Hefeextrakt (HE).

Abbildung 40 zeigt die NIR Lumineszenzkinetik auf den verschiedenen Agarplatten. Es ist zu sehen, dass auf der NaCl Agarplatte die mit Abstand deutlichste  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik bestimmt werden kann. Ein genauerer Blick zeigt, dass es in Anwesenheit von Trypton und Hefeextrakt eine NIR Lumineszenz mit deutlich geringerer Intensität detektiert werden kann. Dabei ist die Abschwächung des Signals bei Trypton stärker als bei Hefeextrakt. Die auf NaCl Agar gemessene NIR Lumineszenz zeigt eine deutliche  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik. Sobald Hefeextrakt oder Trypton hinzugefügt werden, überlagert ein Störsignal die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik. Diese Beobachtung legt nahe, dass ein Quenching durch Proteine die Hauptursache sowohl beim LB Agar als auch beim Malz Agar sind.

Aus Abbildung 39 geht hervor, dass die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf BBM-Agar am wenigsten gequenchet wird. Aus diesem Grund wurde zunächst BBM-Agar für Experimente mit Mikroorganismen verwendet. Es zeigte sich aber in Handversuchen, dass die verwendeten Bakterien- und Pilzkulturen nicht, oder nur äußerst langsam auf BBM-Agarplatten wachsen.

Für Messreihen an Pilzen und Bakterien in Kapitel 4 wurden deshalb Nährmedien gesucht, auf denen Pilze und Bakterien kultiviert werden können, die aber einen möglichst geringen Proteinanteil enthalten. Mit *M9 Medium*, das als Minimal Medium zur Kultivierung von *Escherichia coli* Bakterien dient, wurde ein Nährmedium gefunden, dass diesem Anspruch gerecht wird. Es besteht aus Glucose und verschiedenen Salzen [152]. Es zeigte sich in Handversuchen zudem, dass nicht nur die in Kapitel 4 untersuchte Bakterienkultur, sondern auch alle hier untersuchten Pilzkulturen auf M9-Agarplatten wachsen.

### 3.6 Bestimmung der optimalen Probenpräparation und Messbedingungen

Natürlich sind sowohl die optimale Probenpräparation als auch die optimalen Messbedingungen für jedes Experiment spezifisch. An dieser Stelle soll aber zum einen die Probenpräparation der Experimente in Kapitel 4 motiviert werden und zum anderen werden verschiedene beobachtete Effekte vorgestellt.

Wie bereits erklärt wurde, ist ein Filterpapier als „Zwischenschicht“ empfehlenswert. Es führt zu deutlich höherem Signal-Rausch-Verhältnis bei NIR Lumineszenzmessungen. Die Versorgung der darauf kultivierten Mikroorganismen leidet nicht, da das Nährmedium aus dem Agar in das Filterpapier diffundiert.

Bei den vorherigen Messungen der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf Oberflächen von Agarplatten wurde bereits erwähnt, dass die erste  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzmessung jeweils eine Stunde nach der Probenpräparation stattfand. Der Grund dafür ist, dass sich die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik innerhalb der ersten Stunde nach Probenpräparation deutlich verändert.

Besonders deutlich ist dieser Effekt, wenn auf ein Filterpapier auf einer Agarplatte (im hier gezeigten Beispiel eine BBM Agarplatte) 5  $\mu\text{l}$  einer 1 mM TMPyP- $\text{H}_2\text{O}$  Lösung aufgetropft werden. Obwohl nach etwa einer Minute keine Änderung der Verteilung des TMPyP auf dem Filterpapier mit dem Auge erkennbar ist, zeigen sich deutliche Änderungen der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik in einem Zeitraum von etwa einer dreiviertel Stunde. Abbildung 41 zeigt den Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Amplitude (rechts) und der An- und Abklingzeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik (links) einer Messreihe, bei der zum Zeitpunkt 0 die Photosensibilisator-Lösung auf das Filterpapier aufgetropft wurde.

Die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz wurde auf einem Punkt des Filterpapiers wiederholt für je 10 s gemessen. Die Messung wurde nach drei Stunden gestoppt. Nur die ersten beiden Stunden sind in Abbildung 41 dargestellt, da keine nennenswerten Änderungen in der letzten Stunde zu beobachten sind.



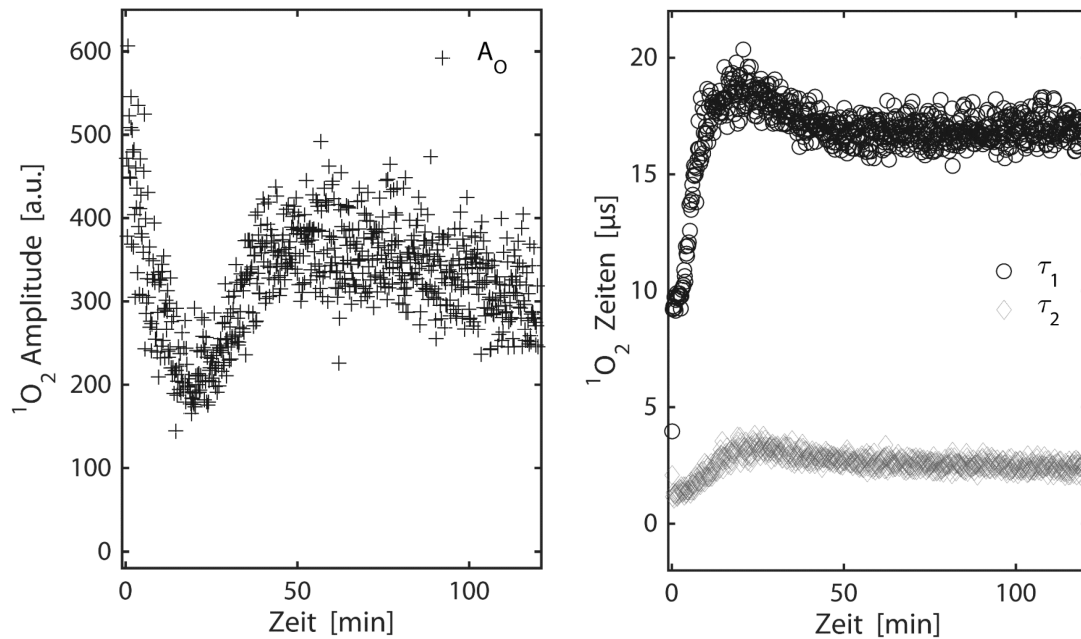


Abbildung 41: Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Amplitude und der Zeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  innerhalb der ersten 120 min nach dem Auftropfen von 5  $\mu\text{l}$  einer 1 mM TMPyP- $\text{H}_2\text{O}$  Lösung auf ein Filterpapier, dass auf einer BBM Agarplatte liegt. Die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz wurde wiederholt für je 10 s gemessen.

Zu beobachten ist zunächst eine Abnahme der  $^1\text{O}_2$  Amplitude, gefolgt von einem Anstieg, gefolgt von einer kontinuierlichen geringen Abnahme der Amplitude, wie sie schon auf TMPyP-PCL zu sehen ist (siehe Abbildung 28). Die Anklingzeit ( $\tau_2$ ) und die Abklingzeit ( $\tau_1$ ) zeigen beide zunächst einen Anstieg, gefolgt von einer leichten Abnahme, bevor beide einen Konstanten Wert erreichen.

Dieser Verlauf konnte auch für einen anderen Photosensibilisator in sehr ähnlicher Form beobachtet werden, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Ursache dieses Effekts eine spezifische Eigenschaft des TMPyPs ist. Nach einer Stunde erreichen aber alle Parameter der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik fast konstante Werte, sodass davon ausgegangen werden kann, dass ein Equilibrium erreicht ist.

Dieser Effekt wird abgeschwächt, wenn die Photosensibilisator Lösung erst auf das Filterpapier gegeben wird, gewartet wird bis das Filterpapier getrocknet ist und dann erst auf die Agarplatte gelegt wird. Aber auch bei dieser Form der Präparation ist eine Änderung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik in einem Zeitraum von etwa einer halben Stunde zu erkennen.

Die Ursache dieses Phänomens liegt vermutlich in der langsamen Vermischung der Photosensibilisator-Moleküle mit dem gelartigen Nährmedium-Agar-Gemisch und der langsamen Diffusion des Nährmedium-Agar-Gemisch in das Filterpapier.

Sowohl An- als auch Abklingzeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik werden länger. Es kann vermutet werden, dass die lokale  $\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration geringer wird, da das Lösungsmittel des TMPyP in die

Agarplatte diffundiert, und somit die  $^1\text{O}_2$  Lebensdauer zunimmt. Die Zunahme der Triplettlebensdauer könnte durch eine Verringerung der lokalen  $\text{O}_2$  Konzentration erklärt werden, Voraussetzung dafür ist, dass die Sauerstofflöslichkeit in Agar geringer ist als in Wasser.

Demnach sollten NIR Lumineszenzmessungen erst eine Dreiviertelstunde nach der Probenpräparation durchgeführt werden. Um Kontaminationen der Probe oder der Umgebung bei der Messung an biologischen Proben zu vermeiden ist eine Versiegelung der Petrischalen in steriler Umgebung ratsam. Um dennoch an diesen Proben NIR Lumineszenz Scans durchführen zu können müssen ein paar Dinge bei der Probenpräparation und der Probeninkubation beachtet werden:

- Der Arbeitsabstand des optischen Systems beträgt 6,5 mm. Um einen mechanischen Konflikt zwischen Detektionslinse und dem Deckel der verwendeten Petrischale zu vermeiden, muss sich die Probenoberfläche sehr nahe am Deckel der Petrischale befinden. Aus diesem Grund sollten Petrischalen entgegen der gängigen Laborpraxis bis kurz unter den Rand der Schale mit Agar gefüllt werden.<sup>7</sup>
- Bei Messungen an versiegelten Proben sammelt sich Kondenswasser an dem Deckel der Petrischale, was zu störenden Streueffekten bei der Lumineszenz Messung an der Probenoberfläche führt. Besonders stark beschlagen die Deckel der Petrischalen bei langen Messungen (erfahrungsgemäß bei Messdauern > 3 Stunden) oder bei schlechter Akklimatisierung der Probe. Wenn eine Inkubation der Proben in einem Brutschrank notwendig ist, sollte die Probe entsprechend dem Laborklima angepasst werden bevor eine Lumineszenzmessung durchgeführt wird. Wenn eine Probe bei 37° C inkubiert wird, beträgt die Akklimatisierungsdauer etwa eine dreiviertel Stunde.
- Wenn pro Agarplatte an mehr als einer Probe ein NIR Lumineszenz Scan durchgeführt werden soll, muss Folgendes bei der Anordnung der Proben auf der Agarplatte bedacht werden. Da derzeit in der Scansoftware nur rechteckige Flächen abgerastert werden können, sollte die Probengeometrie, d.h. die Anordnung der Filterpapiere auf der Agarplatte, so gewählt sein, dass der Abstand zwischen den Proben maximal ist (insbesondere bei stark in die Umgebung diffundierenden Photosensibilisatoren oder flächig wachsenden Mikroorganismen).

Aus diesen Gründen müssen insbesondere bei Messreihen an Proben der Zeitpunkt der Probenpräparation, die Probengeometrie und die Zeitpunkte und Dauern der Lumineszenz Scans geplant und aufeinander abgestimmt werden.

---

<sup>7</sup> 75 ml Agar-Nährmedium-Suspension pro Petrischale.

## 3.7 Empfindlichkeit des Messplatzes bei Singulett-Sauerstoff

### Lumineszenzmessungen auf Nährböden

Bisher wurden die optimalen Bedingungen für die zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz im Hinblick auf Messreihen an Mikroorganismen auf Nährböden erarbeitet, wie sie in Kapitel 4 vorgestellt werden. Dort wird untersucht, ob der direkte Nachweis von  $^1\text{O}_2$ , generiert durch TMPyP und PCor<sup>+</sup>, an Algen, Bakterien und Pilzen gelingt. Um einen Eindruck für die Sensitivität des Messplatzes unter den bisher erarbeiteten Bedingungen zu bekommen, wurde das im Folgenden beschriebene Experiment durchgeführt.

#### 3.7.1 Probenpräparation

Es wurden Konzentrationsreihen der beiden Photosensibilisatoren auf den beiden später verwendeten Nährböden, BBM Agar und M9 Agar, untersucht. Auch in vorherigen Arbeiten mit Mikroorganismen auf Agarplatten wurden Filterpapiere verwendet, um die Diffusion des Photosensibilisators ins Agar zu reduzieren. Als gute Photosensibilisator Menge stellten sich dabei 5 µl einer 1 mM Lösung pro Filterpapier (Ø 5 mm) heraus. Deshalb wurde diese Stoffmenge von 5 nmol pro Filterpapier als Ausgangspunkt für die hier vorgestellte Sensitivitätsuntersuchung verwendet. Eine Reihe von jeweils acht Lösungen der Photosensibilisatoren **TMPyP** und **PCor<sup>+</sup>** in Wasser mit verschiedenen Konzentrationen wurden hergestellt. Ausgehend von einer 1 mM Lösung, wurde die Konzentration der vorherigen Lösung jeweils halbiert. Von den acht Lösungen pro Photosensibilisator wurden jeweils 5 µl auf ein Filterpapier gegeben. Die Stoffmenge des

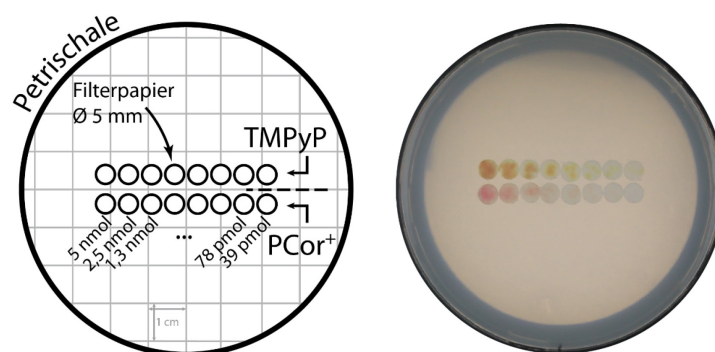


Abbildung 42: Skizze und Foto der Anordnung der Filterpapiere auf der Agarplatte. Auf die Filterpapiere wurden jeweils 5 µl einer TMPyP-Lösung (obere Reihe) bzw. einer PCor<sup>+</sup>-Lösung (untere Reihe) gegeben. Von links nach rechts wurden die Konzentrationen von halbiert von 5 µl einer 1 mM Lösung bis zu 5 µl einer 7,8 µM Lösung. Das Foto zeigt beispielhaft die BBM-Agarplatte.

Photosensibilisators halbiert sich entsprechend von einem Filterpapier zum nächsten, von 5 nmol (5 µl einer 1mM Lösung) bis zu 39 pmol (5 µl einer 7,8 µM Lösung). Da sowohl BBM-Agar als auch M9-Agar untersucht werden sollte, wurden entsprechend zwei Filterpapiere pro Photosensibilisator und Stoffmenge präpariert. Nachdem die Filterpapiere getrocknet waren, wurden sie nebeneinander auf die jeweilige Agarplatte gelegt. Abbildung 42 zeigt eine Skizze der Positionierung der Filterpapiere auf der Agarplatte und ein Foto der Probe. Bei der Probenpräparation wurde sorgfältig darauf geachtet, die 5 µl der jeweiligen Lösung homogen auf dem Filterpapier zu verteilen. Trotzdem ist sowohl in Abbildung 42 als auch in Abbildung 43 eine Inhomogenität in der Verteilung des Photosensibilisators auf dem Filterpapier zu beobachten.

Aus den in Abschnitt 3.6 motivierten Gründen wurde nach dem Positionieren der Filterpapiere auf der Agarplatte eine dreiviertel Stunde gewartet, bevor der erste Scan durchgeführt wurde.

### **3.7.2 Durchführung und Ergebnisse**

Zunächst wurde ein rechteckiger Bereich um alle 16 Filterpapiere als Scanbereich definiert. In diesem Bereich wurde mit einer Schrittweite von 1 mm in x- und y- Richtung sequentiell die NIR Lumineszenz und die Fluoreszenz gescannt. Weitestgehend wurden die in Abschnitt 3.1.3 eingeführten Standardparameter verwendet, allerdings wurde eine zeitliche Kanalbreite von 40 ns verwendet.

Abbildung 43 illustriert die Durchführung und die Auswertung der Messung anhand der Daten der BBM-Agarplatte. Bei der Auswertung wurde der Scanbereich zunächst so aufgeteilt, dass jedes Filterpapier isoliert betrachtet werden kann, illustriert in Abbildung 43 durch die roten gestrichelten Linien auf den Intensitätsplots der Fluoreszenz- und NIR Lumineszenz Scans. Für jeden Pixel wurde dann die Photosensibilisator Fluoreszenzintensität und die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik bestimmt.

Um die verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können mussten Werte für die Fluoreszenzintensität, die  $^1\text{O}_2$  Amplitude sowie die An- und Abklingzeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik für jedes Filterpapier bestimmt werden. Da hier ein Eindruck für die Sensitivität des Messplatzes vermittelt werden soll, wird auf eine Form der Summation oder Mittelung verzichtet. Als Vergleichswerte für jedes Filterpapier dienen die Parameter des Pixels mit der jeweils größten  $^1\text{O}_2$  Amplitude.

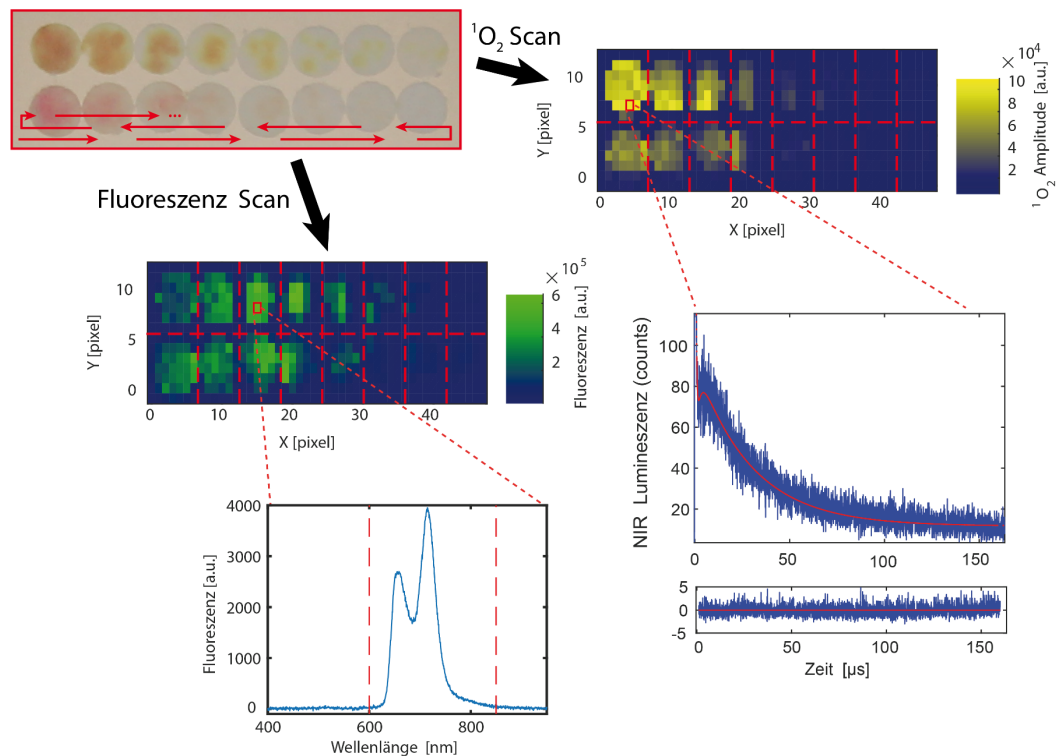


Abbildung 43: Illustration der Messungen und der Datenauswertung. Auf der Oberfläche der Probe sequenziell die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und die Fluoreszenz gescannt. Für jeden Pixel wird sowohl Fluoreszenzintensität als auch die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik bestimmt. Gezeigt sind hier das Foto, sowie die Daten der M9 Agarplatte.

### Fluoreszenzintensität

Als Fluoreszenz Intensität eines Pixels wurde die Summe des für die spezifische Photosensibilisator Fluoreszenz relevanten Bereichs des untergrundkorrigierten Fluoreszenzspektrums errechnet. Als relevante Bereiche für die Summation wurden für TMPyP 600 bis 850 nm und für PCor<sup>+</sup> 550 bis 750 nm erachtet.

### Singulett-sauerstoff Lumineszenzkinetik

Eine Betrachtung der NIR Lumineszenzsignale zeigt, dass die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf der M9 Agarplatte von einem Störsignal überlagert wird. Dieses Störsignal konnte auch bei einem Scan bei 1230 nm detektiert werden und zeigt eine konstante Kinetik. Die Kinetik kann durch eine Kohlrauschfunktion mit  $\tau_{\text{Stör}} = 0,3 \mu\text{s}$  und  $\beta = 0,9$  beschrieben werden. Um die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik zu bestimmen wurde die gemessene NIR Lumineszenzkinetik eines jeden Pixels mit einem Modell angepasst, das einer Überlagerung des Störsignals und einer  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik entspricht.

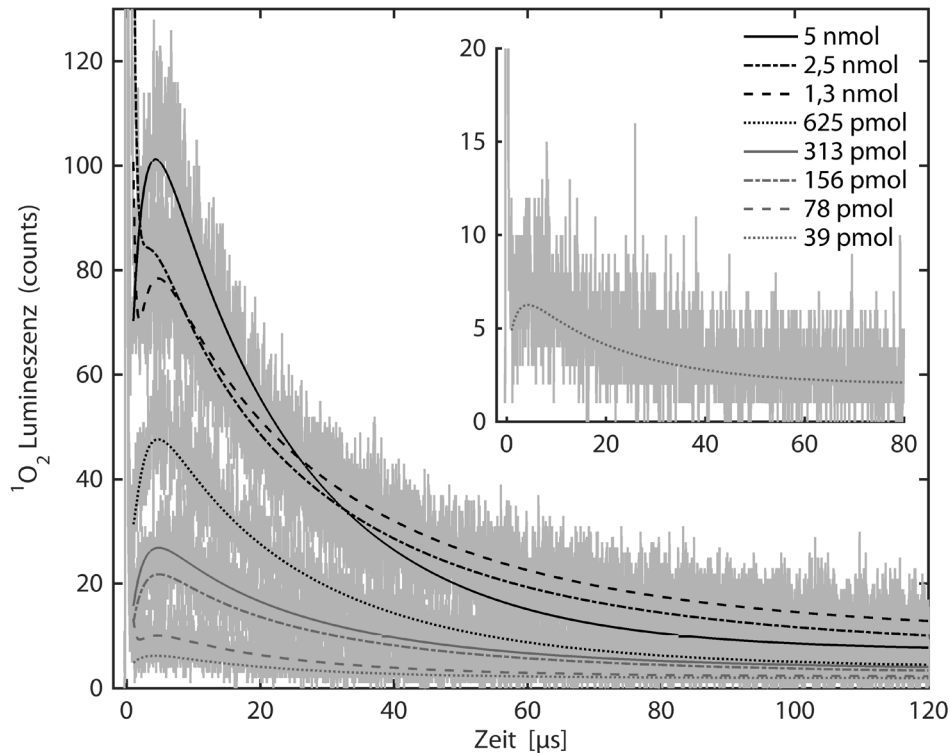


Abbildung 44:  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik der verschiedenen TMPyP Stoffmengen auf einer M9-Agarplatte. Dargestellt ist jeweils der Pixel mit der größten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Amplitude. Auch für die geringste TMPyP Menge ist noch eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik zu erkennen.

Die detektierte NIR Lumineszenz der Pixel mit der jeweils größten  $^1\text{O}_2$  Amplitude eines jeden Bereichs und die jeweiligen Fits sind für die Proben auf der M9 Agarplatte in Abbildung 44 dargestellt. Zu sehen ist, dass auch bei der geringsten Photosensibilisator Menge noch eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik erkennbar ist. Eine Betrachtung der Kinetik zeigt, dass sowohl An- als auch Abklingzeit innerhalb ihrer Konfidenzintervalle übereinstimmen.

Die Amplituden der Pixel mit maximaler  $^1\text{O}_2$  Amplitude pro Filterpapier sind in Abbildung 45 dargestellt. Auch für die geringste Stoffmenge kann eine  $^1\text{O}_2$  Amplitude über 50 detektiert werden. Demnach ist noch bei einem 128stel der ursprünglichen Stoffmenge (5 nmol) eine deutliche  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz detektierbar.

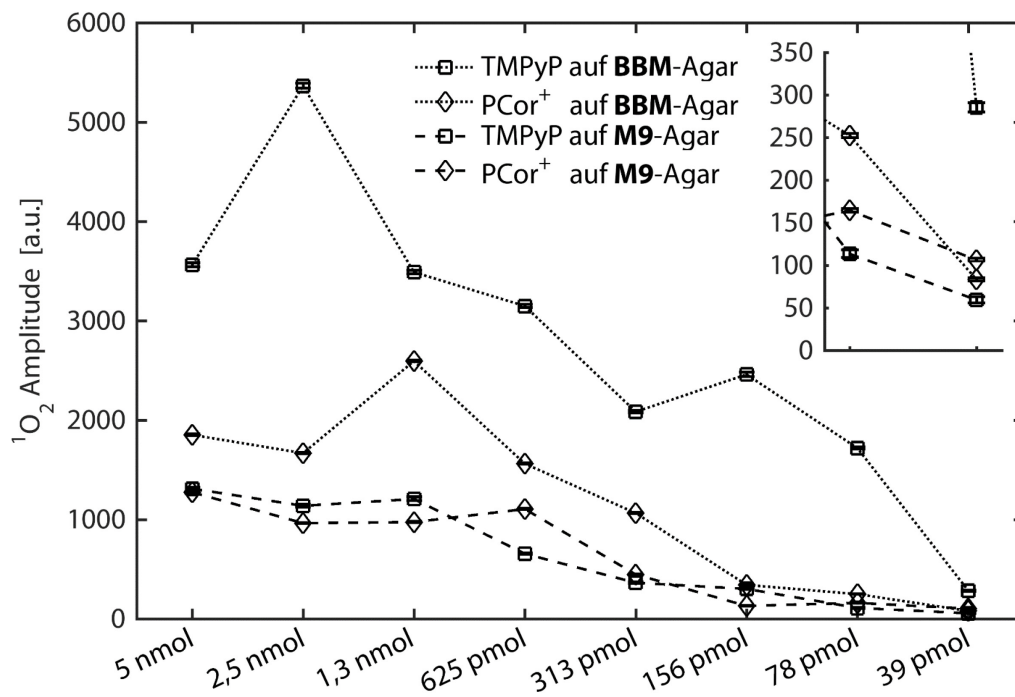


Abbildung 45:  $^1\text{O}_2$  Amplituden von TMPyP und PCor<sup>+</sup> mit abnehmender Stoffmenge auf einer BBM- und M9-Agarplatte. Auch für die geringste Stoffmenge ist noch eine signifikante  $^1\text{O}_2$  Amplitude zu detektieren.

## 4 Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff

### Lumineszenzkinetik an verschiedenen

### Mikroorganismen auf Nährböden

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Messplatz zur zeitaufgelösten Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf Oberflächen geplant, konstruiert und charakterisiert. Dem folgte die Untersuchung zur Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf der Oberfläche verschiedener Nährböden, um optimale Bedingungen für die zeitaufgelöste Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an kultivierten Mikroorganismen zu finden. Als finaler Schritt folgt nun die Untersuchung des Einflusses von Mikroorganismen auf die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, Grundlagen für die Bestimmung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik an Mikroorganismen, die auf Nährböden kultiviert sind, zu schaffen. Um den Einfluss von Mikroorganismen auf die Detektion und die Kinetik der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zu untersuchen, wurden während der verschiedenen Wachstumsphasen der Mikroorganismen immer wieder zeitaufgelöste  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und Photosensibilisator Fluoreszenz Scans durchgeführt. Deshalb wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass die verwendeten Mikroorganismen leben und wachsen. Ein photodynamischer Effekt war nicht gewünscht und wurde durch ständige Dunkellagerung der Proben weitestgehend unterbunden.

Mögliche Anwendungen des Photodynamischen Effekts auf Oberflächen im Sinne der PDI sind äußerst vielfältig. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen sowohl an einem Bakterium als auch an mehreren Eukaryoten durchgeführt. Im Detail wurde ein Wildtyp des gram<sup>-</sup> *Escherichia coli* (*E. coli*), eine Süßwasseralge (eine Art der *Chlorella* Gattung) und zwei Vertreter der Pilze, der Dermatophyt *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) und der Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* (*S. brevicaulis*) untersucht.

Abgesehen von *E. coli*, dessen Generationszeit weniger als eine Stunde beträgt [153], beträgt das Wachstum der hier untersuchten Mikroorganismen mehrere Stunden bis Tage [122,154,155]. Aus diesem Grund sind Messungen über einen Zeitraum von mehreren Tagen notwendig. Wie bereits in Kapitel 3.2.3 gezeigt, können die Zeiten einer  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik durchaus über Tage verglichen werden. Bei der  $^1\text{O}_2$  Amplitude hingegen gibt es Schwankungen über mehrere Tage. Die Betrachtung von Amplituden ist jedoch trotzdem notwendig und sinnvoll, da nur An- oder Abklingzeiten eines Signals mit einer signifikanten Amplitude betrachtet werden können, außerdem können auch Tendenzen eines Amplitudenverlaufs trotz starker Schwankungen erkannt werden.



Es sollte betont werden, dass die genaue Interaktion der verwendeten Photosensibilisatoren mit den verschiedenen Mikroorganismen nur teilweise, für einige Mikroorganismen gar nicht, bekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit kann also nicht, oder nur sehr spekulativ, etwas über die Lokalisierung des Photosensibilisators und den Ursprung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik ausgesagt werden. Die Formulierung „Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an einem Mikroorganismus“ bedeutet im Kontext dieser Arbeit deshalb nur, dass es um die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz in einem System, das aus Photosensibilisatoren und Mikroorganismen besteht gemessen wurde.

In jedem Experiment wird neben einer Probe mit Photosensibilisator und einem Mikroorganismus auch Referenzen des Mikroorganismus und des Photosensibilisators untersucht. Gesucht wird vor allem nach Unterschieden in der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik zwischen den Referenzen und den Proben mit Photosensibilisator und den jeweiligen Mikroorganismen.

## 4.1 Nachweis der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz an gram<sup>-</sup> *Escherichia coli* Bakterien

Als Modellbakterium diente ein Wildtypstamm des *Escherichia coli*. Dieses gram<sup>-</sup> Bakterium wurde bereits erfolgreich durch TMPyP und PCor<sup>+</sup> photodynamisch inaktiviert [56]. Voruntersuchungen zeigten, dass dieses Bakterium auf M9 Agar kultiviert werden kann. Die Voruntersuchungen zeigten aber auch, dass die Detektion von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz bei hohen Bakterienkonzentrationen nicht möglich ist. Im Vergleich der vier Mikroorganismen, die in dieser Arbeit untersucht werden, wächst *E. coli* deutlich schneller als die anderen. Die Generationszeit beträgt 22 bis 40 Minuten [153]. Da ein Scan der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz pro Filterpapier etwa 15 Minuten dauert und eine Probe aus einer Referenz für den Mikroorganismus, einer Referenz für den Photosensibilisator und einer Probe mit Mikroorganismus und Photosensibilisator besteht, liegt damit die Dauer eines <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz Scans nahe an der Generationszeit. Voruntersuchungen zeigten, dass das Wachstum auf M9 Agar deutlich langsamer ist als auf Lysogeny Broth (LB) Agarplatten, welche sonst für die Kultivierung von *E. coli* verwendet werden. Um das Wachstum der *E. coli* auf M9 Agar für dieses Experiment weiter zu verlangsamen, wurden die Platten nicht in einem Inkubator, sondern bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Um verschiedene Bakterienkonzentrationen während einer Messung untersuchen zu können, wurden drei Bakteriensuspensionen mit jeweils verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Diese drei Bakteriensuspensionen wurden auf Filterpapiere mit Photosensibilisator gegeben. Als Referenzen wurde ein Filterpapier mit Bakteriensuspension aber ohne Photosensibilisator und ein Filterpapier mit Photosensibilisator aber ohne Bakteriensuspension verwendet. Über einen Zeitraum von mehreren Tagen wurden Scans der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz und der Fluoreszenz auf der Probenoberfläche durchgeführt.

Da die Ergebnisse dieser Untersuchung eine deutliche Änderung der Proben mit hohen Konzentrationen in einem kurzen Zeitraum zeigten, wurde das Experiment noch einmal mit geringeren Bakterienkonzentrationen wiederholt. Da die Probenpräparation und die Durchführung des zweiten Experiments bis auf die Bakterienkonzentration gleich waren, wird auf dieses zweite Experiment nur wenig eingegangen.

### 4.1.1 Probenpräparation

Eine Übernackkultur *E. coli* in LB Medium wurde für 10 Minuten bei 800g ab zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurde in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert.

Diese Stammlösung wurde für das erste Experiment in zwei Schritten jeweils 1:20 mit PBS verdünnt. Für das zweite Experiment wurde die Stammlösung 1:100, 1:500 und 1:1000 verdünnt. Über die optische Dichte von jeweils 200 µl der drei Bakteriensuspensionen in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten wurde die Bakterienkonzentration in koloniebildenden Einheiten (CFU, *colony forming units*) bestimmt. Diese sind in Tabelle 3 dargestellt.

*Tabelle 3 E. coli Konzentrationen der verwendeten Bakteriensuspensionen im ersten und zweiten Experiment*

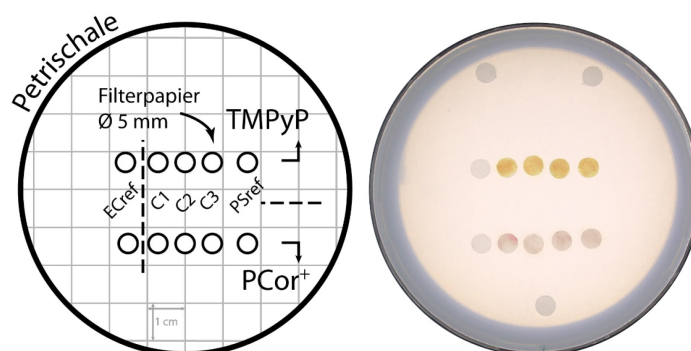
Bezeichnung der Bakteriensuspension	Bakterienkonzentration [CFU]	... im zweiten Experiment [CFU]
(Stammlösung) EC1	$4 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$
EC2	$4 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^7$
EC3	$2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$

Auf jeweils vier Filterpapiere (Ø 5 mm) pro Photosensibilisator wurden 5 µl einer 1mM TMPyP-beziehungsweise PCor<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O Lösung gegeben. Zwei Filterpapiere wurden analog, jedoch nur mit H<sub>2</sub>O ohne Photosensibilisator behandelt. Diese dienen als Bakterienreferenz (ECref).

Nach dem Eintrocknen der Lösungen wurden diese zehn Filterpapiere gemäß der Geometrie in : Abbildung 46 auf einer M9 Agarplatte verteilt. Nach einer halben Stunde wurden jeweils 5 µl der drei Bakteriensuspensionen auf die Filterpapiere pipettiert. Auf die Bakterienreferenzen wurden 5 µl der Stammlösung, auf die Photosensibilisator Referenzen 5 µl PBS pipettiert. Die Proben wurden folgendermaßen bezeichnet:

- ECref: 5 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl EC1
- C1: 5 µl PS + 5 µl EC1
- C2: 5 µl PS + 5 µl EC2
- C3: 5 µl PS + 5 µl EC3
- PSref: 5 µl PS + 5 µl PBS

PS steht dabei für entweder TMPyP oder PCor<sup>+</sup>.



*Abbildung 46: Foto und Skizze der Anordnung der Proben auf der Petrischale. Auf dem Foto sind drei am Rand der Petrischale positionierten Filterpapiere erkennbar. Diese wurden mit den drei Bakteriensuspensionen behandelt, um ein Bakterienwachstum zu überwachen.*

### 4.1.2 Durchführung und Ergebnisse

Über einen Zeitraum von 9 Tagen wurden jeweils direkt hintereinander  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und Fluoreszenz Scans durchgeführt. Der erste  $^1\text{O}_2$  Scan wurde eine Stunde nach der Probenpräparation gestartet. Es wurde jeweils eine Fläche von 40 x 10 mm um die Filterpapiere des jeweiligen Photosensibilisators und der entsprechenden Bakterienreferenz abgerastert. An Tag 1 und Tag 5 wurde zusätzlich ein NIR Scan bei 1230 nm durchgeführt. Die Parameter waren dabei die gleichen wie beim  $^1\text{O}_2$  Scan bei 1270 nm. Die Lumineszenz Scans wurden durch den Deckel der Petrischale durchgeführt um eine Kontamination der Probe zu vermeiden wurden. Im Folgenden werden zunächst die TMPyP Ergebnisse präsentiert, gefolgt von den PCor<sup>+</sup> Ergebnissen.

#### TMPyP

Abbildung 47 zeigt Fotos (oben) und Intensitätsplots der Fluoreszenzintensität (mitte) und der  $^1\text{O}_2$  Amplitude (unten) an Tag 0, dem Tag der Probenpräparation, und Tag 2. An den Fotos ist an allen Proben, abgesehen von der Photosensibilisator Referenz, ein deutliches Bakterienwachstum an Tag 2 zu erkennen.

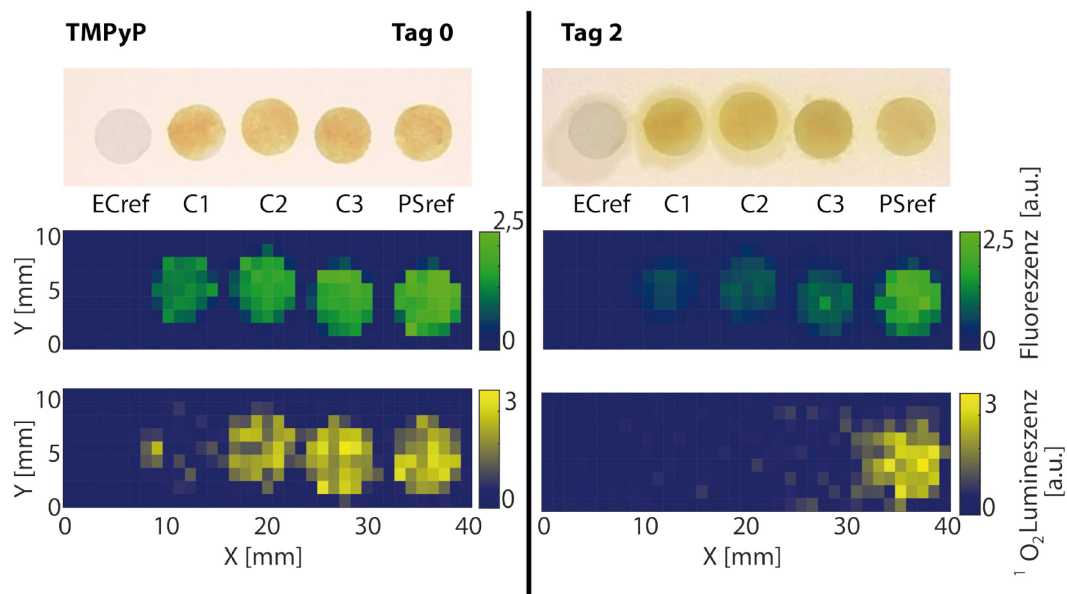


Abbildung 47: Vergleich von Foto (oben) und Intensitätsplots der Fluoreszenzintensität (mitte) und  $^1\text{O}_2$  Amplitude (unten) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation) und Tag 2. An Tag 0 ist eine deutliche Abhängigkeit zwischen der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zur Bakterienkonzentration zu beobachten. An Tag zwei ist an den Bakterienproben C1-C3 noch eine Photosensibilisator Fluoreszenz zu sehen, aber kaum  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zu sehen.

Die Fluoreszenz zeigt am Tag 0 eine geringe Abhängigkeit zur Bakterienkonzentration. Am Tag 2 ist eine deutliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität zum Wachstum der Bakterien zu erkennen. Auch die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zeigt eine ähnliche Abhängigkeit der Amplitude zur initialen

Bakterienkonzentration an Tag 0. An Tag 2 ist, abgesehen von der Photosensibilisator Referenz, keine signifikante  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz im Intensitätsplot zu erkennen.

In den Intensitätsplots ist eine deutliche räumliche Abhängigkeit zwischen den Lumineszenzen, Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz, und dem Filterpapier zu erkennen. Im Folgenden wird gezeigt, wie die in Abbildung 47 dargestellte  $^1\text{O}_2$  Amplitude bestimmt wurde, zusammen mit einer Analyse der NIR Lumineszenzkinetik.

Aufgrund der Korrelation der Lumineszenzen mit dem Filterpapier wurde zur Analyse der NIR Lumineszenzkinetik das gemessene Signal aller Pixel eines Filterpapiers aufsummiert. So wurde pro Tag und pro Probe (also pro Filterpapier) eine NIR Lumineszenzkinetik errechnet. Abbildung 48 zeigt links die so bestimmten NIR Lumineszenzkurven für die *E. coli*-TMPyP Proben C1 und C3 für Tag 0 und Tag 2. Rechts ist der Verlauf der NIR Lumineszenzkinetik für die TMPyP Referenz zu sehen. Am Tag 0 ist die Lumineszenzkinetik an C3 und der TMPyP Referenz nahezu gleich. Zwei Tage später hingegen ist die TMPyP Referenz fast unverändert, die Lumineszenzkinetik an C3 jedoch deutlich geringer, zudem hat sie sich offenbar verändert. C1 zeigt hingegen schon an Tag 0 eine deutlich andere  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik, an Tag 2 ist nur noch eine sehr schwache  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz erkennbar.

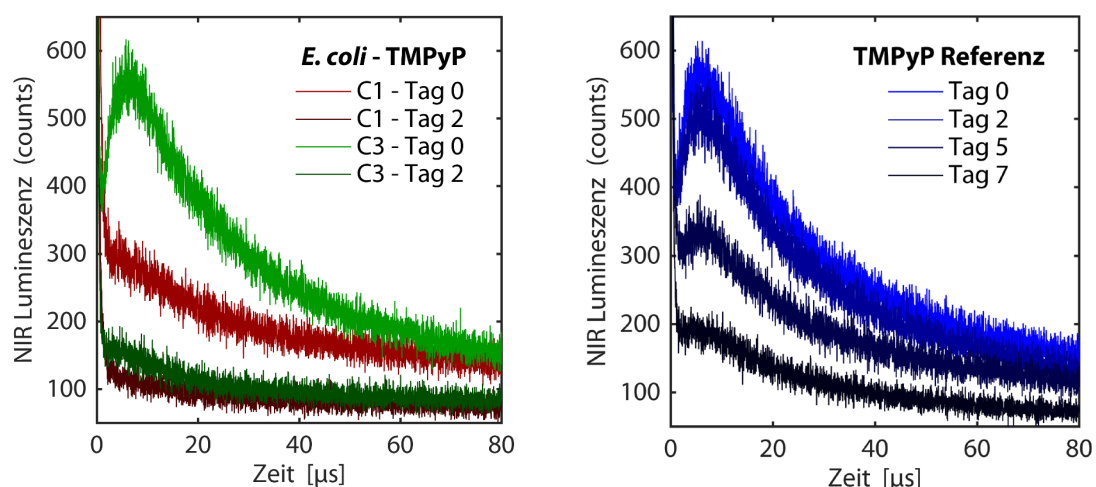


Abbildung 48: NIR Lumineszenz der drei *E. coli* –TMPyP Proben C1 und C3 (links) an Tag 0 und Tag 2 und der TMPyP Referenz (rechts) im Verlauf einer Woche. Gezeigt ist die Summe von je 25 Pixeln.

Es ist also eine Veränderung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Bakterienkonzentration zu beobachten. Auch die TMPyP Referenz zeigt eine Änderung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik über die Zeit, jedoch in einem weitaus längeren Zeitraum. Hierbei ist anzumerken, dass auf Fotos der Proben über den gesamten Zeitraum kein Bakterienwachstum auf den Photosensibilisator Referenzen beobachtet werden konnte.

Ziel ist es nun, die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik aus der Kinetik der gemessenen NIR Lumineszenz zu extrahieren. Um Störsignale zu identifizieren wurden deshalb zunächst die NIR Lumineszenzsignale bei 1230 nm und die der *E. coli* Referenz untersucht. Die NIR Lumineszenzkinetik bei 1230 nm (siehe Abbildung 49) und die der *E. coli* Referenz zeigen ein Störsignal. Ein Vergleich aller Signale zeigte, dass es sich durch folgende Funktion annähern lässt:

$$f(t) = A_{\text{Stör}} e^{-\left(\frac{t}{0,1\mu\text{s}}\right)^{0,3}}$$

Diese Funktion entspricht einer Kohlrauschfunktion mit einer sehr kurzen Abklingzeit von  $0,1\mu\text{s}$  und einem  $\beta$  von  $0,3$ . Ein Fit dieser Funktion an die NIR Lumineszenz, gemessen an der *E. coli* Referenz der TMPyP Reihe an Tag 5 ist in Abbildung 50 dargestellt.

Dementsprechend wurde ein Kinetikmodell mit drei Kompartimenten verwendet, um die NIR Lumineszenzkinetik zu bestimmen. Neben zwei Kompartimenten, die den

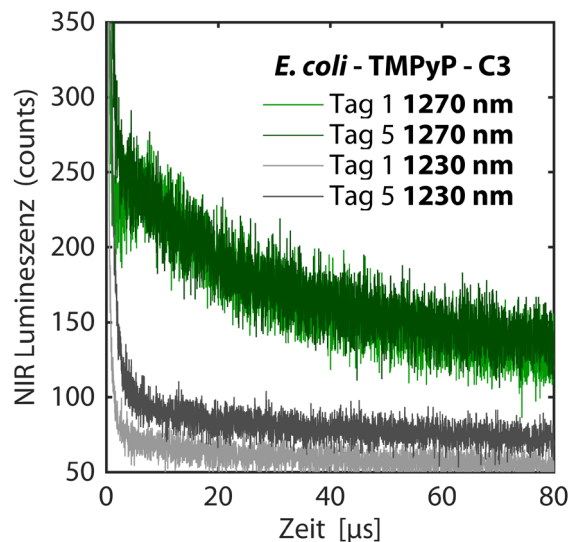


Abbildung 49: Vergleich der NIR Lumineszenz von C3 An Tag 1 und Tag 5, gemessen bei 1270 nm (grün) und 1230 nm (grau).

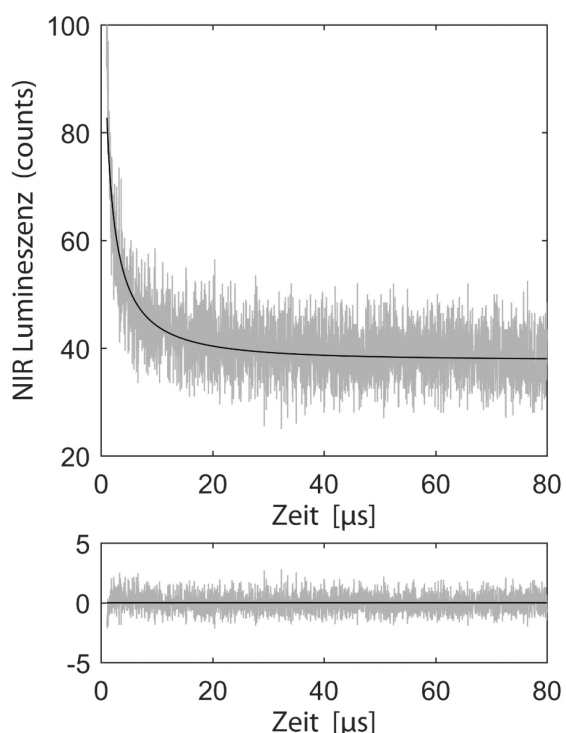


Abbildung 50: NIR Lumineszenzkinetik der *E. coli* Referenz der TMPyP Messreihe an Tag 5. Sie lässt sich durch eine Kohlrauschfunktion mit  $\tau=0,1$  und  $\beta=0,3$  annähern.

Photosensibilisator und den  $^1\text{O}_2$  repräsentieren, wurde ein drittes, von den anderen beiden Kompartimenten unabhängiges Kompartiment mit einer konstanten Kinetik (Kohlrauschfunktion mit  $\tau_{\text{Stör}}=0,1$  und  $\beta=0,3$ ), aber freier Amplitude  $A_{\text{Stör}}$ , in das Modell aufgenommen. Durch dieses dritte

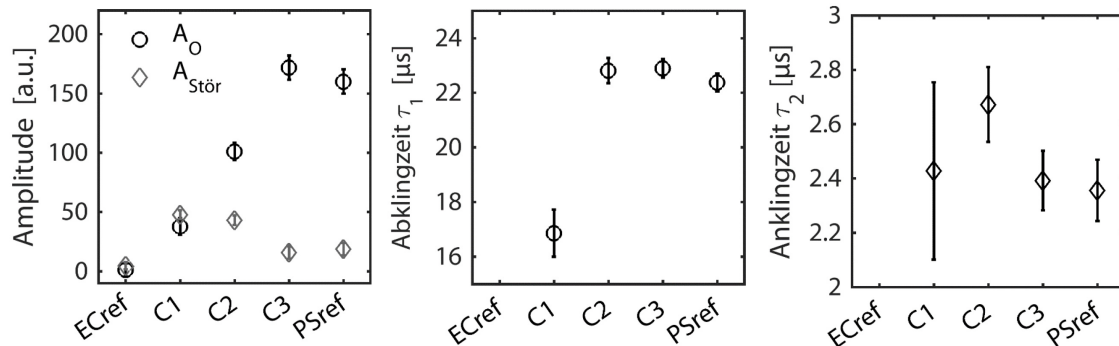


Abbildung 51: Kinetikparameter und ihre Konfidenzintervalle der TMPyP- E. coli Probe an Tag 0, also eine Stunde nach der Probenpräparation. In der Amplitude ist eine deutliche Korrelation zur Bakterienkonzentration zu beobachten. Die Abklingzeit ist für C2, C3 und die Photosensibilisator Referenz gleich, nur C1 zeigt eine deutlich kürzere Abklingzeit. Die Anklingzeit ist innerhalb der Konfidenzintervalle gleich.

Kompartiment, das Störsignal, konnte jedoch eine mögliche Photosensibilisator Phosphoreszenz nicht mehr quantifiziert werden.

Mit diesem Modell wurde jeder Pixel einzeln gefittet. Die in Abbildung 47 dargestellten  $^1\text{O}_2$  Amplituden entsprechen den  $^1\text{O}_2$  Amplituden aus diesem Fit. Zunächst sind in Abbildung 51 die gefitteten Parameter und ihre Konfidenzintervalle für den Scan an Tag 0 gezeigt. Zu sehen ist, dass die  $^1\text{O}_2$  Amplitude  $A_0$  mit geringer werdender Bakterienkonzentration zunimmt und die Amplitude der Probe C3 mit der Amplitude der Photosensibilisator Referenz übereinstimmt. Die Abklingzeit ist, abgesehen von C1, gleich. Die Anklingzeiten stimmen innerhalb ihrer Konfidenzintervalle alle überein.

Bei der Betrachtung des Verlaufs der Parameter über mehrere Tage wird zunächst nur auf C3 und die Photosensibilisator Referenz eingegangen, da alle Proben außer C3 nach einem Tag bereits keine nennenswerte  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz mehr zeigten. Der Verlauf der Photosensibilisator Fluoreszenz, der  $^1\text{O}_2$  Amplitude und der Amplitude des Störsignals über den gesamten Zeitraum des Experiments ist in Abbildung 52 dargestellt. Die Fluoreszenz zeigt eine nahezu konstante Intensität für die Photosensibilisator Referenz, aber auch für die Bakterien Probe C3.

Die Amplitude des Störsignals zeigt weder eine Tendenz, noch ist ein Unterschied zwischen der Photosensibilisator Referenz und der Probe C3 zu erkennen. Die Photosensibilisator Referenz zeigt ein deutliches  $^1\text{O}_2$  Signal, dass nach etwa einer Woche abnimmt. An C3 ist nur an Tag 0 ein

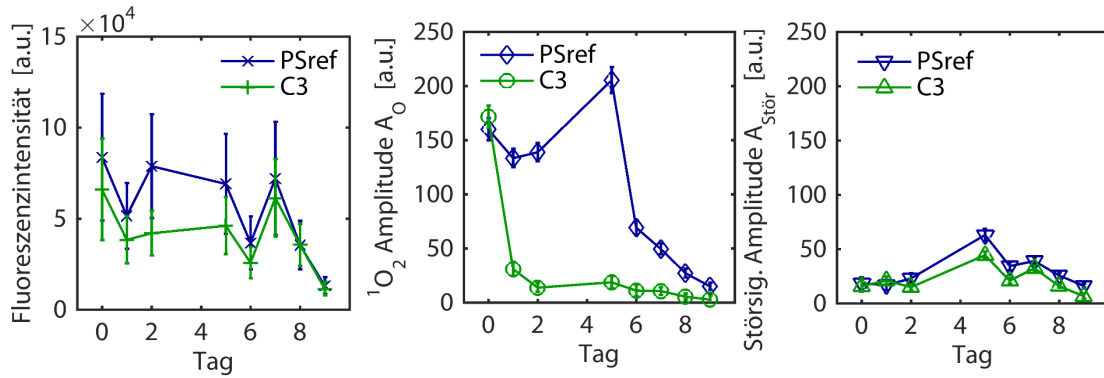


Abbildung 52: Verlauf der TMPyP Fluoreszenz (links), der  $^1\text{O}_2$  Amplitude (mitte) und der Amplitude des Störsignals (rechts) über den gesamten Zeitraum des Experiments. Bereits an Tag 1 ist die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz stark gequencht, während die Fluoreszenzintensität unverändert

deutliches  $^1\text{O}_2$  Signal zu erkennen, eine Amplitude, deren untere Grenze des Konfidenzintervalls größer 0 ist, lässt sich jedoch bis Tag 8 bestimmen.

Die Betrachtung des Verlaufs der An- und Abklingzeiten wurde auf die ersten Tage des Experiments beschränkt. In Abbildung 53 ist dieser Verlauf dargestellt. Die Anklingzeiten sind innerhalb der Konfidenzintervalle konstant. Die Abklingzeit der Photosensibilisator Referenz zeigt eine geringe abfallende Tendenz. Die Abklingzeit der Probe C3 fällt hingegen von 22  $\mu\text{s}$  an Tag 0 auf 10  $\mu\text{s}$  an Tag 2. Um diese Tendenz zu verifizieren, wurde das Experiment mit geringeren Bakterienkonzentrationen wiederholt. Die Fluoreszenzintensität und die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Amplitude zeigten auch in diesem Experiment die gleiche Tendenz wie im ersten Experiment. Auch die Anklingzeit war innerhalb der Konfidenzintervalle konstant und gleich zu der im ersten Experiment. In der rechten Darstellung von Abbildung 53 ist der Verlauf der Abklingzeiten gezeigt.

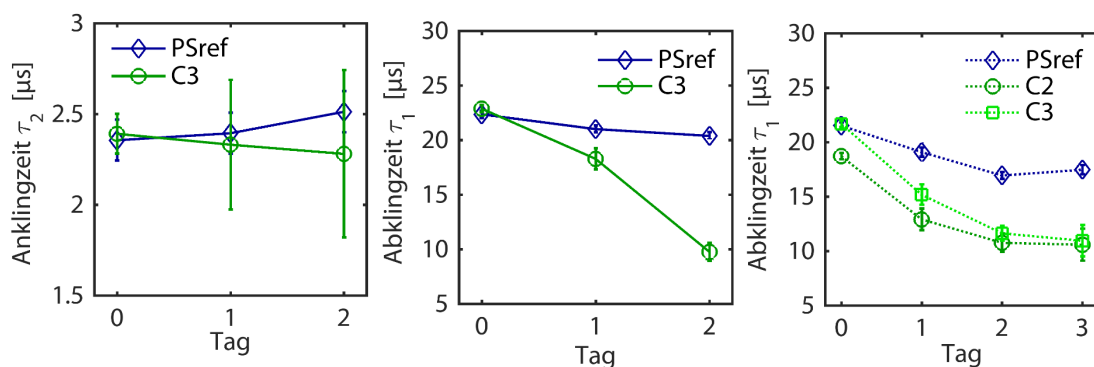


Abbildung 53: Verlauf der Anklingzeit (links) und der Abklingzeit (mitte) der TMPyP Referenz und der Probe C3. Rechts ist der Verlauf der Abklingzeit, der im zweiten Experiment mit geringeren Bakterienkonzentrationen ermittelt wurde. Die initiale Bakterienkonzentration von C3 im ersten und C2 im zweiten Experiment waren ungefähr gleich. C3 im zweiten Experiment entspricht einer deutlich geringeren initialen Bakterienkonzentration.

Zu beachten ist dabei, dass gemäß den Konzentrationen der Bakteriensuspensionen (siehe Tabelle



3) die Probe C3 des ersten Experiments und die Probe C2 des zweiten Experiments vergleichbar sind. C3 des zweiten Experiments entspricht einer deutlich geringeren initialen Bakterienkonzentration.

Im zweiten Experiment ist die fallende Tendenz der Abklingzeit der Photosensibilisator Referenz ausgeprägter als im ersten Experiment. Jedoch ist auch im zweiten Experiment eine deutlich stärkere Abnahme der Abklingzeit mit zunehmendem Bakterienwachstum erkennbar.

### PCor<sup>+</sup>

Abbildung 54 zeigt Fotos (oben) und Intensitätsplots der Fluoreszenzintensität (mitte) und der fehlergewichteten <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Amplitude (unten) an Tag 0, dem Tag der Probenpräparation, und Tag 2. An den Fotos ist an allen Proben, abgesehen von der Photosensibilisator Referenz und C1, ein deutliches Bakterienwachstum an Tag 2 zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität zeigt am Tag 0 nur eine geringe räumliche Abhängigkeit zum Filterpapier. An Tag 2 ist die Fluoreszenzintensität fast gleichverteilt über den gesamten Scanbereich.

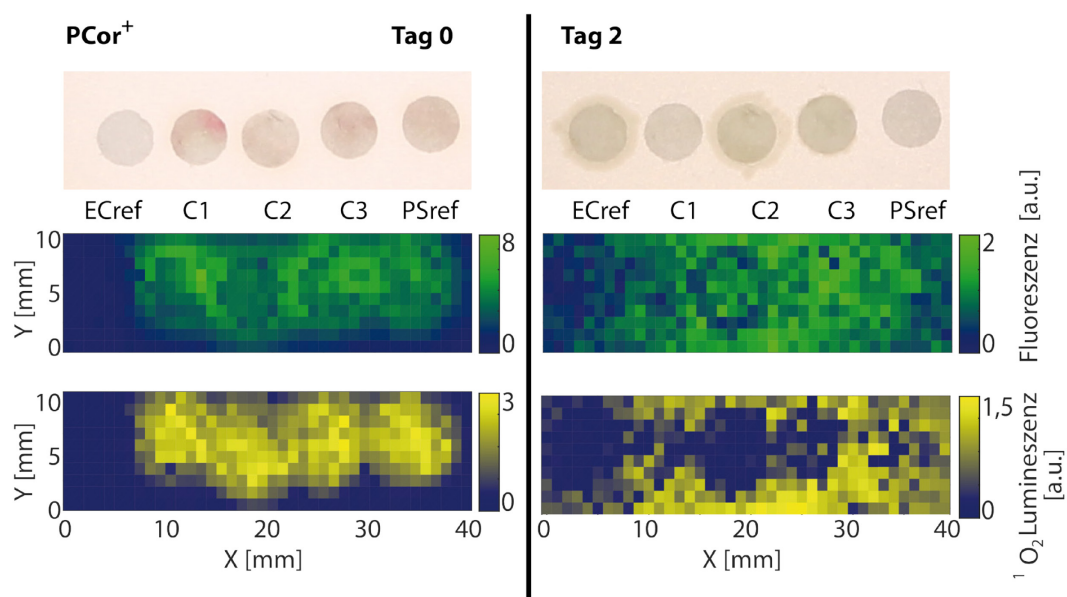


Abbildung 54: Vergleich von Foto (oben) und Intensitätsplots der Fluoreszenzintensität (mitte) und <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Amplitude (unten) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation) und Tag 2. Im Vergleich zu TMPyP zeigt die Lumineszenz von PCor<sup>+</sup> keine deutliche räumliche Abhängigkeit zu den Filterpapieren. An Tag 2 ist die Photosensibilisator Fluoreszenz nahezu über den gesamten Scanbereich gleichverteilt. Die Verteilung der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz zeigt eine Abhängigkeit zum Bakterienwachstum: Am Ort des Bakterienwachstums ist keine <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz erkennbar.

Auch die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an Tag 0 zeigt eine starke Abhängigkeit zur Fluoreszenzintensität, nicht aber zur initialen Bakterienkonzentration. An Tag zwei ist eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz nur noch in Gebieten zu erkennen, in denen kein Bakterienwachstum beobachtet werden kann.

Die gemessene NIR Lumineszenz weist das gleiche Störsignal auf, dass auch schon an den TMPyP Proben beobachtet werden konnte. Die Analyse der NIR Lumineszenzkinetik wurde analog zu der Analyse der an den TMPyP Proben detektierten NIR Lumineszenz durchgeführt. Diese zeigte, dass keine Korrelation der Fluoreszenzintensität oder der  $^1\text{O}_2$  Amplitude zu initialen Bakteriensuspension gefunden werden konnte. Auch die starke Abnahme der  $^1\text{O}_2$  Amplitude innerhalb der ersten 24 Stunden ist bei den PCor<sup>+</sup> Proben sehr ähnlich zu den TMPyP Proben.

Allerdings ist hier eine Betrachtung des Verlaufs von An- und Abklingzeit, analog zu der oben vorgestellten Betrachtung der Ergebnisse der TMPyP Proben interessant. Auch wenn bei den PCor<sup>+</sup> Proben keine eindeutige, reproduzierbare Tendenz zu erkennen ist, sind die Abklingzeiten insgesamt deutlich kürzer als die der TMPyP Proben. Die Anklingzeiten hingegen sind sehr ähnlich zu denen, die auf den TMPyP Proben ermittelt wurden.

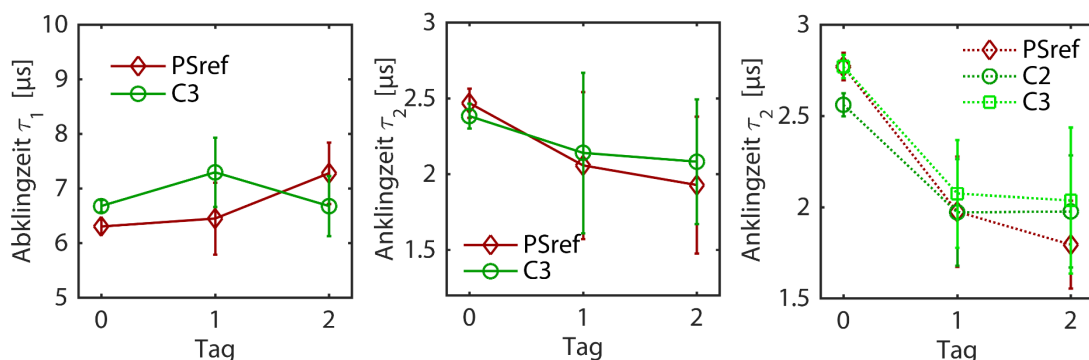


Abbildung 55: Verlauf der Abklingzeit (links) und der Anklingzeit (mitte) der PCor<sup>+</sup> Referenz und der Probe C3. Rechts ist der Verlauf der Anklingzeit, der im zweiten Experiment mit geringeren Bakterienkonzentrationen ermittelt wurde.

### 4.1.3 Diskussion

Zunächst hat das Experiment gezeigt, dass ein direkter Nachweis von  $^1\text{O}_2$  durch die zeitaufgelöste Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an einem System mit *E. coli* Bakterien möglich ist. Über einen Zeitraum von bis zu drei Tage lässt sich eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik bestimmen. Die PDI von *E. coli* unter Laborbedingungen dauert meist nur weniger Stunden [56]. Demnach gelingt über den gesamten PDI-relevanten Zeitraum die zeitaufgelöste Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz.

Der Vergleich der Fotos zu den Intensitätsbildern der Photosensibilisator Fluoreszenz und der  $^1\text{O}_2$  Amplituden zeigt zunächst, dass TMPyP eine Abhängigkeit beider Lumineszenzen zur initialen

Bakterienkonzentration und eine laterale Abhängigkeit zum Filterpapier aufweist. PCor<sup>+</sup> hingegen zeigt keine Abhängigkeit zur initialen Bakterienkonzentration. Die Verteilung der Lumineszenz über den gesamten Scanbereich innerhalb von wenigen Tagen spricht für eine Diffusion von PCor<sup>+</sup> in den Agar.

Für beide Photosensibilisatoren deutet die deutliche Abnahme der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz, bei nahezu unveränderter Photosensibilisator Fluoreszenz, mit steigendem Bakterienwachstum auf ein starkes Quenching des <sup>1</sup>O<sub>2</sub> durch Bakterien hin. Es ist jedoch bei geringen Bakterienkonzentrationen möglich, eine <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik zu bestimmen.

Die Betrachtung der An- und Abklingzeiten der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik zeigt, dass die Anklingzeit für beide Photosensibilisatoren nahezu gleich ist und die Abklingzeit deutlich verschieden ist. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Anklingzeit von etwa 2,3 µs der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lebensdauer entspricht.

An den TMPyP Proben konnte innerhalb zweier Experimente eine fallende Tendenz der Abklingzeit reproduzierbar beobachtet werden. Diese deutet demnach auf eine Verkürzung der Triplettlebensdauer des TMPyP mit steigender Bakterienkonzentration hin. In der Masterarbeit von Alexander Müller wurden <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz Untersuchungen an TMPyP-*E. coli* –Suspensionen durchgeführt. Auch in wässriger Lösung wurde dabei eine Änderung der Triplettlebensdauer bei steigender Bakterienkonzentration gefunden. [56]

Aufgrund starker Probe-Probe-Variabilität bei *E. coli* Proben müssten die hier beobachteten Effekte allerdings durch mehrfache Wiederholung bestätigt werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Bakterien eine deutliche NIR Lumineszenz detektiert, und aus dieser auch eine <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik extrahiert werden kann. Für TMPyP gibt es auch Hinweise auf eine Korrelation zwischen der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik und der Bakterienkonzentration.

## 4.2 Nachweis der Singulett-Sauerstoff Lumineszenz an Dermatophyten und Schimmelpilzen

Nachdem die Möglichkeiten der zeitaufgelösten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Detektion an *E. coli* Bakterien getestet wurde, werden nun zwei Experimente vorgestellt, in denen die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik an zwei Pilzarten über einen längeren Zeitraum untersucht wurde.

Im Zuge einer Studie mit dem Ziel der photodynamischen Behandlung von Nagelmykose wurden zwei Pilzarten gewählt: der Dermatophyt *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) und der Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* (*S. brevicaulis*).

Nagelmykose ist eine Infektionskrankheit, bei der die Finger- oder Zehennägel von Pilzen befallen sind. Sie ist keine schwere, aber weit verbreitete Krankheit. Hervorgerufen wird die Nagelmykose hauptsächlich durch die Dermatophyten *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, weniger häufig aber auch durch Schimmelpilze wie *Scopulariopsis brevicaulis* oder *Aspergillus species pluralis*.

Derzeit erfolgt die Behandlung durch systemische oder topische Applikation von Fungiziden. Diese Behandlungsmöglichkeiten sind aber ineffektiv, teuer und langwierig, was die Notwendigkeit der Suche nach alternativen Behandlungsmethoden der Nagelmykose impliziert. Auch hier bietet die PDI eine potentielle Alternative. Erste Photodynamische Inaktivierungen von *T. rubrum* unter *in vitro* Bedingungen wurden bereits berichtet [129,156,157]. [129,158]

### 4.2.1 Probenpräparation

Die Probenpräparation wurde dankenswerter Weise von Nedaa Shamali durchgeführt. *T. rubrum* und *S. brevicaulis* wurden von einem Patienten der Universitätsklinik Greifswald isoliert und auf Sabouraud Dextrose Agar kultiviert.

Von drei Wochen alten Agarplatten wurden Sporen von *T. rubrum* und *S. brevicaulis* mit Impfösen entnommen und in je 1 ml PBS (1 % Tween®) suspendiert. Die optischen Dichten der Stammsuspensionen bei 535 nm betrugen 0,55 für *T. rubrum* und 0,402 für *S. brevicaulis*. Für das Experiment wurden neben der Stammlösung (C4) auch drei verdünnte Sporensuspensionen C3 (1:10), C2 (1:100) und C1 (1:1000) hergestellt.

Für dieses Experiment wurde pro Photosensibilisator und pro Pilzart eine Agarplatte hergestellt. Eine zu dem *E. coli* Experiment analoge Anordnung ist durch das flächige Wachstum von *T. rubrum* und *S. brevicaulis* nicht möglich. Im Folgenden wird die Präparation einer Agarplatte vorgestellt, die drei anderen wurden analog präpariert:

Auf fünf Filterpapiere (Ø 5 mm) wurden 5 µl einer 1 mM wässrigen Photosensibilisator Lösung gegeben. Ein Filterpapier wurde analog, jedoch nur mit H<sub>2</sub>O ohne Photosensibilisator behandelt. Diese dient als Pilzreferenz (FRef). Nach dem Eintrocknen der Lösungen wurden die 6 Filterpapiere gemäß der Geometrie in Abbildung 56 auf einer M9 Agarplatte verteilt. Nach einer halben Stunde wurden jeweils 5 µl der vier Sporensuspensionen auf die Filterpapiere pipettiert. Auf die Pilzreferenz wurden 5 µl der Stammlösung, auf die Photosensibilisator Referenzen 5 µl PBS pipettiert. Die Proben wurden folgendermaßen bezeichnet:

- FCref: 5 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl C4
- C4: 5 µl PS + 5 µl C4
- C3: 5 µl PS + 5 µl C3
- C2: 5 µl PS + 5 µl C2
- C1: 5 µl PS + 5 µl C1
- PSref: 5 µl PS + 5 µl PBS

Aufgrund des Wachstums und den sporenbildenden Eigenschaften der beiden Pilzarten wurden die

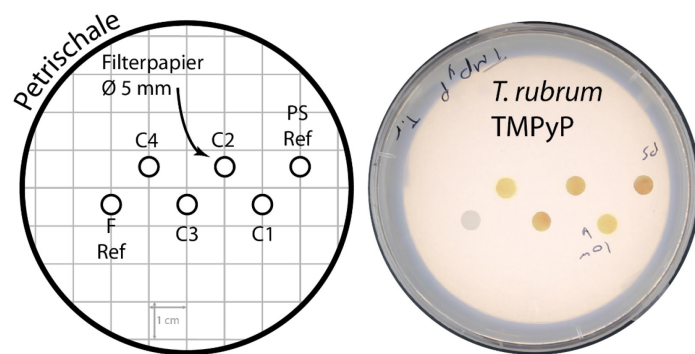


Abbildung 56: Skizze der Anordnung der Proben auf der Petrischale. Auf dem Foto ist als Beispiel die Petrischale der TMPyP-T. rubrum Probe gezeigt.

Proben nach der Präparation mit Parafilm versiegelt. Da die flächig wachsenden Pilze schnell auch auf der Photosensibilisator Referenz wuchsen, wurden separate Photosensibilisator Referenzen (sep. PSref), analog zu dieser Beschreibung, aber auf separaten Petrischalen, präpariert. Dafür wurden zunächst je 5 µl einer 1mM wässrigen TMPyP- bzw. PCor<sup>+</sup>-Lösung auf je ein Filterpapier (Ø 5 mm) pipettiert. Nach dem Eintrocknen der Photosensibilisator Lösung wurden die Filterpapiere mittig auf zwei M9-Agarplatte positioniert.

## 4.2.2 Durchführung und Ergebnisse

Erste Photosensibilisator Fluoreszenz- und <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz Scans über eine Fläche von 6 x 2 cm um die Proben herum wurden etwa eine Stunde nach Probenpräparation durchgeführt. Danach wurden Scans der vier Proben mit wechselnden Zeitabständen über einen Zeitraum von bis zu 24 Tagen durchgeführt. Auf den separaten Photosensibilisator Referenzen wurde jeweils ein Bereich von 1 x 1 cm um das Filterpapier herum abgescannt.

Abbildung 57 zeigt einen Vergleich von Fotos mit Intensitätsplots der Photosensibilisator Fluoreszenz und der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Amplitude der TMPyP-S. brevicaulis Probe. Da sich die Beobachtungen zwischen S. brevicaulis und T. rubrum nur wenig unterscheiden, wird in der Diskussion der lateralen

Intensitätsverteilungen nur die *S. brevicaulis* Probe diskutiert. Ein Vergleich der Fotos mit der TMPyP Fluoreszenz zeigt eine deutliche laterale Abhängigkeit der Fluoreszenz mit den Filterpapieren. Die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zeigt an Tag 0 nicht nur eine Abhängigkeit zu den Filterpapieren, sondern auch zur initialen Sporenkonzentration. An Tag 3 ist die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf den Proben mit hoher initialer Sporenkonzentration nicht mehr erkennbar. An Tag 13 ist auch auf der Photosensibilisator Referenz kaum noch  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zu erkennen.

An Tag 24 ist sie jedoch wieder deutlich erkennbar und es zeigt sich eine laterale Abhängigkeit der Fluoreszenz und der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz, nicht nur zu den Filterpapieren, sondern auch zum Pilzbewuchs. In den Bereichen in denen Sporenwachstum erkennbar ist, also in den dunklen Bereichen auf dem Foto, ist auch eine geringe TMPyP Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz erkennbar.

Die Fotos zeigen auch, dass sich mit der Zeit Kondenswasser an der Unterseite der versiegelten Petrischale sammelt. Die Auswirkung des Kondenswassers auf Lumineszenz Scans zeigt sich sowohl bei der Photosensibilisator Fluoreszenz als auch bei der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz.

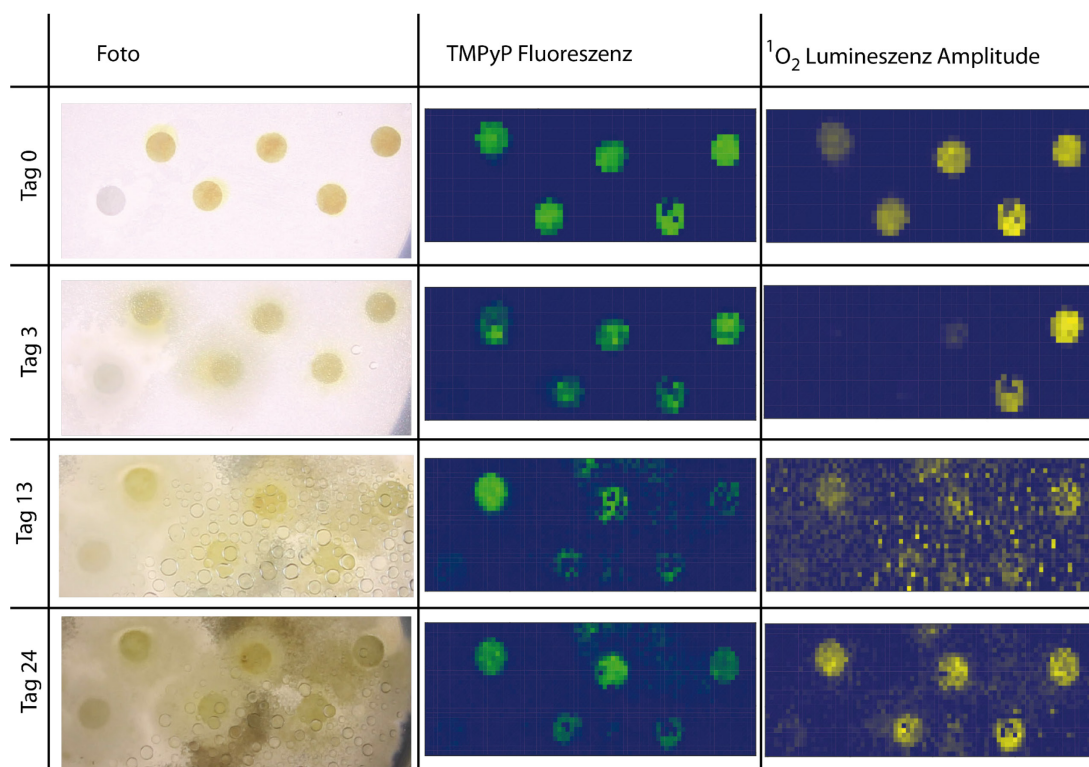


Abbildung 57: Bilder der TMPyP- *S. brevicaulis* Probe. Vergleich von Foto (links), Fluoreszenzintensität (mitte) und  $^1\text{O}_2$  Amplitude (rechts) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation), Tag 3, Tag 13 und Tag 24.

Analog zu Abbildung 57 zeigt Abbildung 58 einen Vergleich von Fotos mit Intensitätsplots der Photosensibilisator Fluoreszenz und der  $^1\text{O}_2$  Amplitude der PCor<sup>+</sup>-*S. brevicaulis* Probe. Im Gegensatz zu TMPyP ist hier nach Tag 0 PCor<sup>+</sup> Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auch außerhalb



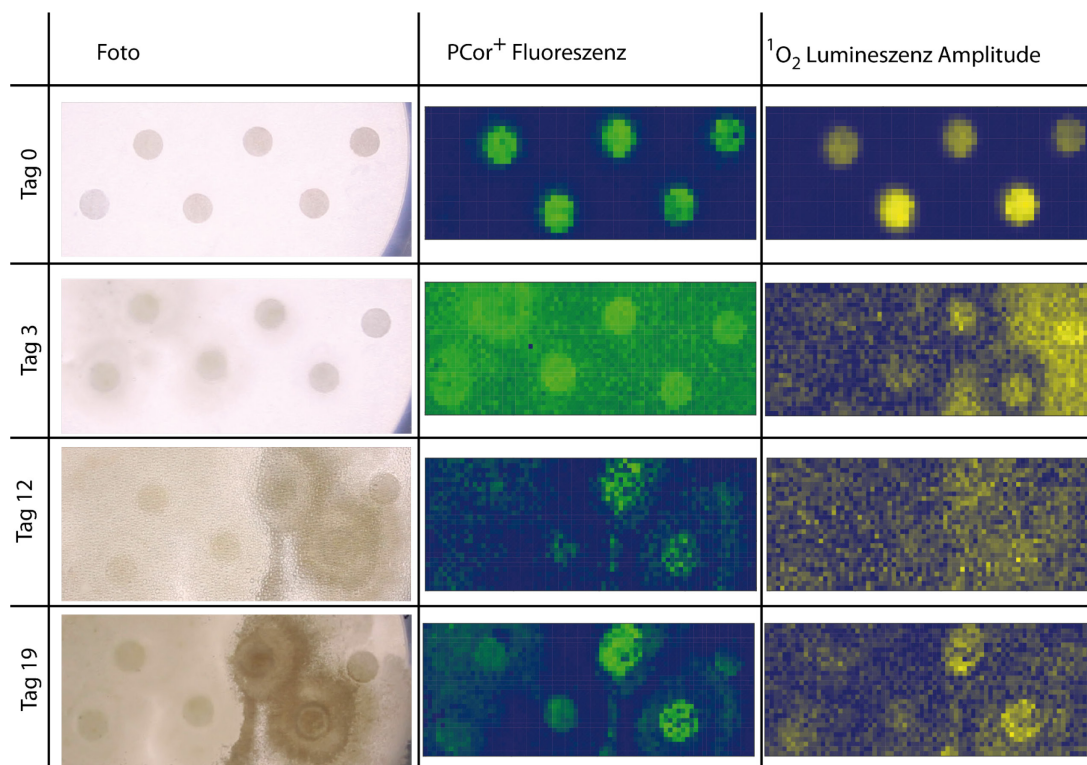


Abbildung 58: Bilder der PCor<sup>+</sup>-*S. brevicaulis* Probe. Vergleich von Foto (links), Fluoreszenzintensität (mitte) und <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Amplitude (rechts) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation), Tag 3, Tag 12 und Tag 19.

des Bereichs des Filterpapiers zu beobachten, eine Abhängigkeit zu den Filterpapieren kann aber beobachtet werden. An Tag 3 ist im Bereich der Hyphen deutlich weniger <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz zu erkennen. An Tag 12 ist kaum <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz zu erkennen, das entsprechende Foto zeigt allerdings deutliche Kondenswasserbildung, was eine Detektion durch Streuung erschwert. An Tag 19 ist auch bei der PCor<sup>+</sup> Probe eine Abhängigkeit zwischen sporenbildenden Pilzen und der PCor<sup>+</sup> Fluoreszenz und der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz zu erkennen.

Abbildung 59 zeigt beispielhaft die NIR Lumineszenzkinetik für C1 der TMPyP-*S. brevicaulis* Probe und C4 der PCor<sup>+</sup>-*S. brevicaulis* Probe. Eine eindeutige <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik ist, abgesehen von Tag 0, nur an Tag 3 an der C1-TMPyP-*S. brevicaulis* Probe zu erkennen. Ein deutliches Störsignal ist hingegen für beinahe alle gezeigten NIR Lumineszenzkurven erkennbar. Dieses Störsignal wird auch auf den Pilz Referenzen aller *T. rubrum* und *S. brevicaulis* Proben und bei Scans bei 1230 nm detektiert.

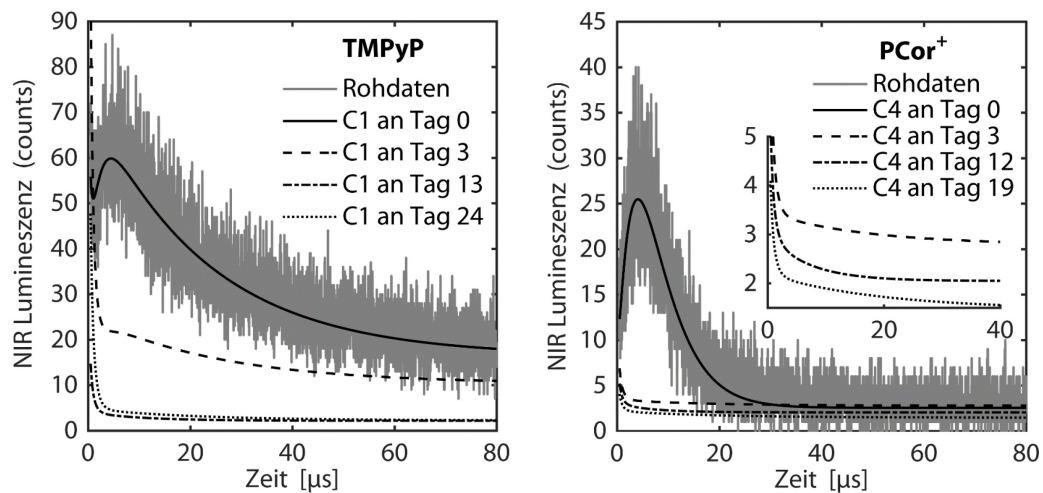


Abbildung 59: NIR Lumineszenzkinetik des Pixels mit der höchsten  $^1\text{O}_2$  Amplitude der C1-TMPyP-S. brevicaulis Probe (links), also der Probe mit der geringsten initialen Sporenkonzentration und der C4-PCor<sup>+</sup>-S. brevicaulis Probe, also der Probe mit der höchsten initialen Sporenkonzentration.

Nach einer Analyse der detektierten NIR Lumineszenz konnte das Störsignal durch eine Kohlrauschfunktion mit  $\tau_{\text{Stör}} = 0,3 \mu\text{s}$  und  $\beta = 0,7$  beschrieben werden. Dementsprechend wurde als Kinetikmodell ein Drei-Kompartiment-Modell verwendet. Zwei Kompartimente entsprechen Photosensibilisator und Sauerstoff. Das dritte, von den anderen beiden unabhängige, Kompartiment entspricht dem Störsignal. Mit diesem Modell wurde die NIR Lumineszenz eines jeden Pixels gefittet. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass in Abbildung 57 und Abbildung 58 die  $^1\text{O}_2$  Amplituden gezeigt sind, das Störsignal also keinen Einfluss auf die Bildgebung hat. In Anbetracht des sehr geringen Signal-Rausch-Verhältnisses (siehe Abbildung 59) ist die räumliche Anhängigkeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zu der Probenstruktur ein Hinweis darauf, dass die hier angewandte Methode der Extraktion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik aus einer NIR Lumineszenzkinetik auch bei sehr kleinen  $^1\text{O}_2$  Amplituden zu realistischen Ergebnissen führen kann.

Die Analyse der Lumineszenz Scans an den *T. rubrum* Proben brachte zunächst sehr ähnliche Erkenntnisse. Eine Analyse der NIR Lumineszenzkinetik zeigte jedoch, dass eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik bis zu einer Woche nach Probenpräparation sowohl für die TMPyP- *T. rubrum* Proben, als auch für die PCor<sup>+</sup>-*T. rubrum* Proben bestimmt werden kann. Abbildung 60 zeigt beispielhaft die NIR Lumineszenzkinetik (links) und die extrahierte  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik (rechts) der C3 TMPyP-*T. rubrum* Probe bis Tag 9. Eine Analyse der Amplituden bestätigt diese Erkenntnisse: Eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik mit einer  $^1\text{O}_2$  Amplitude, deren untere Grenze des Konfidenzintervalls größer 0 ist, kann sowohl für TMPyP als auch PCor<sup>+</sup> an *T. rubrum* bis zu einer Woche detektiert werden. Weiter zeigt eine Analyse der Amplituden, dass das Störsignal über den gesamten



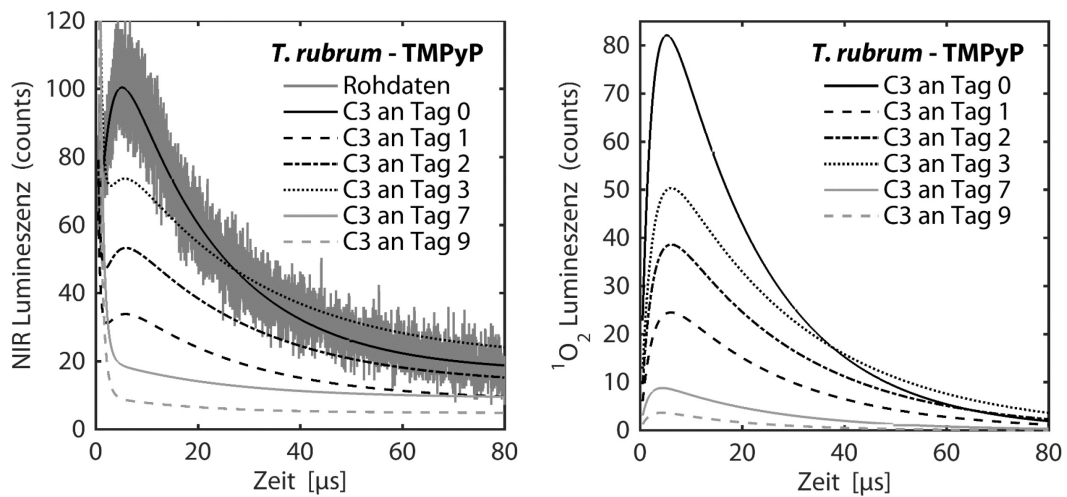


Abbildung 60: NIR Lumineszenzkinetik (links) und daraus extrahierte  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik der C3 *T. rubrum* – TMPyP Probe. Gezeigt ist wieder der Pixel mit der höchsten Amplitude.

Zeitraum des Experiments im Rahmen der Streuung konstant ist und die  $^1\text{O}_2$  Amplituden bereits einen Tag nach der Probenpräparation keine Abhängigkeit zur initialen Sporenkonzentration zeigen. Die Photosensibilisator Referenzen zeigen das gleiche Störsignal mit deutlich geringerer Amplitude.

Wie bereits angeführt, wurden neben der Photosensibilisator Referenz auf den Agarplatten mit den Pilzen zusätzliche Photosensibilisator Referenzen, auf separaten Agarplatten, in dem Experiment mitgeführt. Der Grund ist in den Fotos in Abbildung 57 und Abbildung 58 zu sehen: Die flächig wachsenden Pilze bewachsen auch die Photosensibilisator Referenz. Im folgenden Vergleich der Verläufe der An- und Abklingzeit über einen Zeitraum von sieben Tagen wird diese separate Photosensibilisator Referenz (sep. PSref) mit aufgeführt.

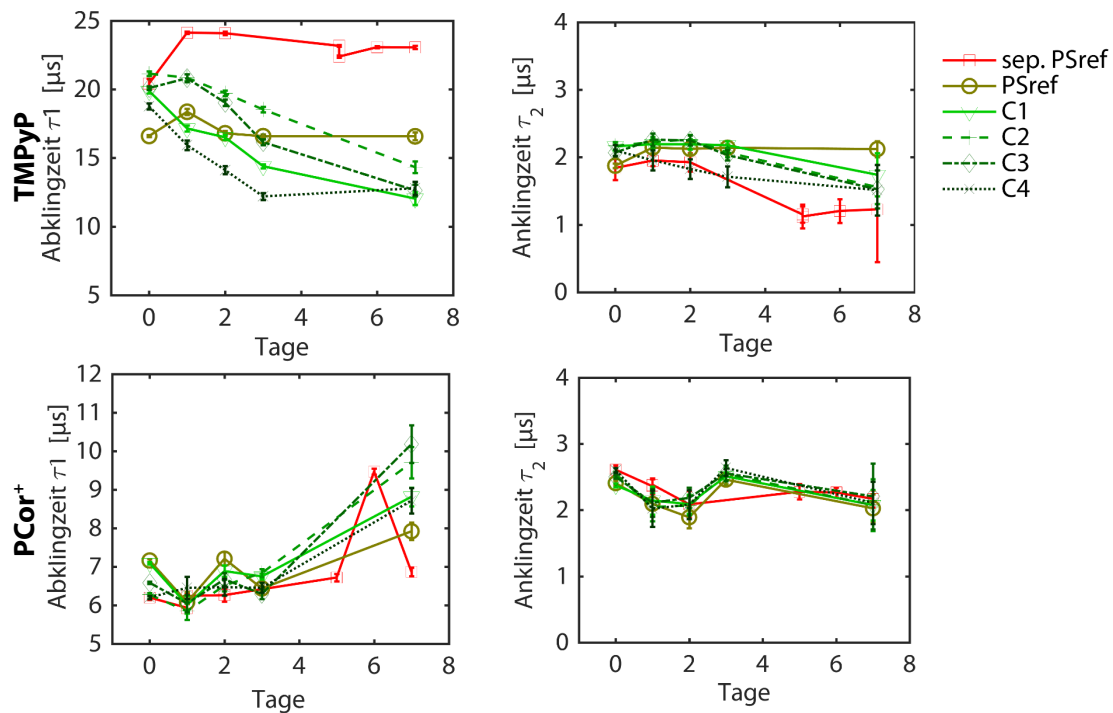


Abbildung 62: Verlauf der Abklingzeit  $\tau_1$  (links) und der Anklingzeit  $\tau_2$  (rechts) der TMPyP-T. rubrum (oben) und PCor<sup>+</sup>-T. rubrum (unten). Die Werte und ihre Fehlerbalken repräsentieren den fehlergewichteten Mittelwert und dessen Standardabweichung über den gesamten Scanbereich einer jeden Probe.

In Abbildung 62 sind die Verläufe der An- und Abklingzeit aller TMPyP- und PCor<sup>+</sup>-*T. rubrum* Proben, sowie der separaten Photosensibilisator Referenzen gezeigt. Die Werte und Fehlerbalten entsprechen dabei dem fehlergewichteten Mittelwert und Standardabweichung aller An- oder Abklingzeiten eines Probenbereichs. Die Anklingzeit ist für alle Proben relativ konstant. Die Abklingzeit liegt für die PCor<sup>+</sup>-*T. rubrum* Probe in einem Bereich von etwa 5 bis 10  $\mu\text{s}$ , und eine Tendenz, die über Schwankungen hinausgeht, ist nicht zu erkennen. Für TMPyP hingegen ist eine Abklingzeit von 10 bis 25  $\mu\text{s}$  zu sehen, zudem zeigt sich nach Tag 0 für die separate Photosensibilisator Referenz eine konstante, deutlich längere Abklingzeit als für alle TMPyP-*T. rubrum* Proben. Diese zeigen eine fallende Tendenz.

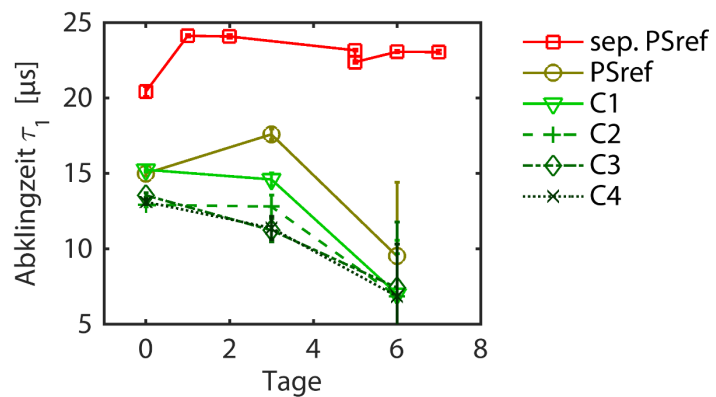


Abbildung 61: Verlauf der Abklingzeit aller TMPyP-S. brevicaulis Proben.

Abbildung 61 zeigt den Verlauf der Abklingzeiten der TMPyP-

*S. brevicaulis* Proben. Auch hier ist eine fallende Tendenz der Abklingzeiten der PCor<sup>+</sup>-*S. brevicaulis* Proben zu erkennen.

### 4.2.3 Diskussion

Der direkte Nachweis von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> über die zeitaufgelöste Detektion der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz an beiden hier untersuchten Pilzen ist gelungen. Über einen Zeitraum von einer Woche lässt sich eine <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik bestimmen. Eine photodynamische Therapie einer Nagelpilzinfektion sollte nicht länger als einen Tag dauern. Auch bisherige Photodynamische Inaktivierungen von *T. rubrum* zeigten innerhalb weniger Tage Erfolg [157]. Über den gesamten PDI-relevanten Zeitraum ist demnach ein direkter Nachweis von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> durch die Detektion der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz möglich.

Insbesondere beim Schimmelpilz *S. brevicaulis* zeigt sich eine räumliche Abhängigkeit der Photosensibilisator Fluoreszenz und der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz mit den sporenbildenden Teilen der Pilze. Für TMPyP kann eine deutliche Abhängigkeit der Photosensibilisator Fluoreszenz und der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz mit den Filterpapieren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist bei PCor<sup>+</sup> bereits einen Tag nach Probenpräparation eine Verteilung beider Lumineszenzen über den gesamten Scanbereich zu beobachten. Dabei besteht immer eine Abhängigkeit zwischen der Photosensibilisator Fluoreszenz und der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz.

Die Kinetik der detektierten NIR Lumineszenz zeigt eine Überlagerung eines Störsignals mit einer <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik. Das Störsignal konnte sowohl bei 1230 nm, als auch auf den Pilz Referenzen detektiert werden. Auch die Photosensibilisator Referenzen zeigt dieses Störsignal, jedoch mit deutlich geringerer Amplitude.

Eine Analyse der Zeiten zeigt, dass für alle Proben eine Anklingzeit von etwa 2 µs bestimmt werden konnte. Diese Zeit ist für beide Photosensibilisatoren gleich. Die Abklingzeit unterscheidet sich jedoch deutlich. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Anklingzeit um die <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lebensdauer handelt und dementsprechend die Abklingzeit der Triplett Lebensdauer des Photosensibilisators entspricht. Demnach gibt es Hinweise auf eine abfallende Tendenz der Triplettlebensdauer von TMPyP mit steigender Pilzkonzentration, sowohl für den Dermatophyten *T. rubrum* als auch für den Schimmelpilz *S. brevicaulis*.

## 4.3 Nachweis der Singulett-sauerstoff Lumineszenz an Grünalgen

Die Entwicklung einer effizienten PDI von phototrophen Biofilmen ein wichtiges Forschungsgebiet, da von der Zerstörung von Bausubstanz durch phototrophe Biofilme eine große Gefahr ausgeht. Pohl et al. konnten 2015 berichten, dass Grünalgen am Beispiel des Typs *Chlorella fusca* var. *vacuolata* photodynamisch Inaktiviert werden können [36]. Diese Grünalge wurde auch hier als Modell eines phototrophen Organismus gewählt um zu testen, ob eine Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz während der PDI möglich ist.

Die Photodynamische Inaktivierung der Grünalge dauerte bei Pohl et al. mehrere Tage. Deshalb wurden die Proben so präpariert, dass an mehreren Tagen hintereinander vergleichbare  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzmessungen durchgeführt werden konnten. Diese Studie wurde in Teilen bereits veröffentlicht [37].

### 4.3.1 Probenpräparation und Durchführung

Die Präparation der Proben wurde dankenswerterweise von Jakob Pohl ausgeführt. Ein Strang *Chlorella fusca* var. *vacuolata* (SAG 211-8b) wurde als Modellorganismus verwendet. Eine Suspensionskultur wurde vor dem Experiment für drei Tage in Bold's Basal Medium (BBM) kultiviert. Dafür wurde die Suspension bei Raumtemperatur bei 250 rpm rotiert und in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Tageslichtlampe beleuchtet. Vor dem Experiment wurde der Algenkultur neues Nährmedium zugeführt.

Das Experiment wurde auf BBM-Agarplatten mit mittig positioniertem Filterpapier durchgeführt. In der Mitte des Filterpapiers ( $\varnothing$  90 mm) wurden 200  $\mu\text{l}$  einer Algensuspension mit einer Zelldichte von  $7 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$  und 5  $\mu\text{l}$  einer 1 mM, wässrigen Photosensibilisator Lösung kreisförmig ( $\varnothing$  5-7 mm) aufgetragen. Abbildung 63 zeigt eine Skizze und ein Foto der Probe. Proben mit Algen ohne Photosensibilisator und Photosensibilisator ohne Algen

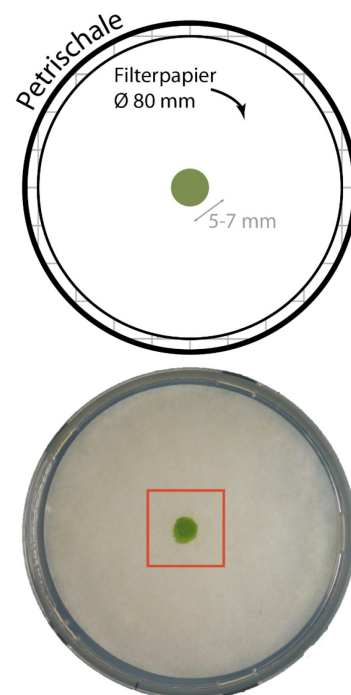


Abbildung 63: Skizze und Foto der Anordnung der Probe auf der Petrischale. Der rot umrandete Bereich auf dem Foto entspricht dem Scanbereich.

dienten als Referenzen. Zwischen den Photosensibilisator Fluoreszenz und NIR Lumineszenz Scans wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert und im 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Tageslichtlampe beleuchtet.

Über einen Zeitraum von vier Tagen wurde die NIR Lumineszenz sowie die Fluoreszenz zweimal pro Tag auf einer Fläche von 8 x 6 cm gescannt. An Tag 1, also einen Tag nach der Probenpräparation, wurde zusätzlich ein Scan der NIR Lumineszenz bei 1230 nm durchgeführt. Die NIR Lumineszenz wurde pro Pixel für 20 s mit einer Anregungsenergie von 0,5  $\mu\text{J}$  gemessen. Im Gegensatz zu den beiden Experimenten in den Abschnitten 4.1 und 4.2, wurde im hier vorgestellten Experiment die 600  $\mu\text{m}$  Faser verwendet.

### 4.3.2 Ergebnisse

Abbildung 64 zeigt Fotos sowie Intensitätsplots der Fluoreszenz des gesamten Spektralbereichs und der  $^1\text{O}_2$  Amplitude. Obwohl  $^1\text{O}_2$  in geringen Mengen in der Photosynthese generiert wird [159], ist keine signifikante  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz bei der Algenreferenz zu detektieren. Allerdings zeigt sie eine deutliche Fluoreszenz. Als phototrophe Organismen verfügen Grünalgen über einen

*Abbildung 64: Fotos, Intensitätsplots der gemessenen Fluoreszenzintensität und der  $^1\text{O}_2$  Amplitude der Algenreferenz, der PCor<sup>+</sup>-Algen Probe und der TMPyP Probe an Tag 1, also einen Tag nach der Probenpräparation.*

Photosynthese Apparat. Es ist bekannt, dass an Photosynthese Apparaten eine deutliche, in ihrer Kinetik jedoch sehr komplexe Fluoreszenz zu detektieren ist [160]. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass die hier gemessene Fluoreszenz der erwarteten Superposition der Fluoreszenzspektren vom Photosystem I und dem Photosystem II entspricht [161,162].

Bei der TMPyP-Algen Probe ist eine deutliche räumliche Abhängigkeit von Algen, Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigt die PCor<sup>+</sup>-Algen Probe zwar eine Abhängigkeit zwischen Algen und Fluoreszenz, die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz ist jedoch homogen über den gesamten Scanbereich verteilt.

Die Betrachtung der Fluoreszenzspektren der beiden verwendeten Photosensibilisatoren und dem Emissionsspektrum der Algen (siehe Abbildung 65) zeigt, dass beim TMPyP eine spektrale Unterscheidung von der Fluoreszenz von Photosensibilisator und Algen nicht möglich ist.

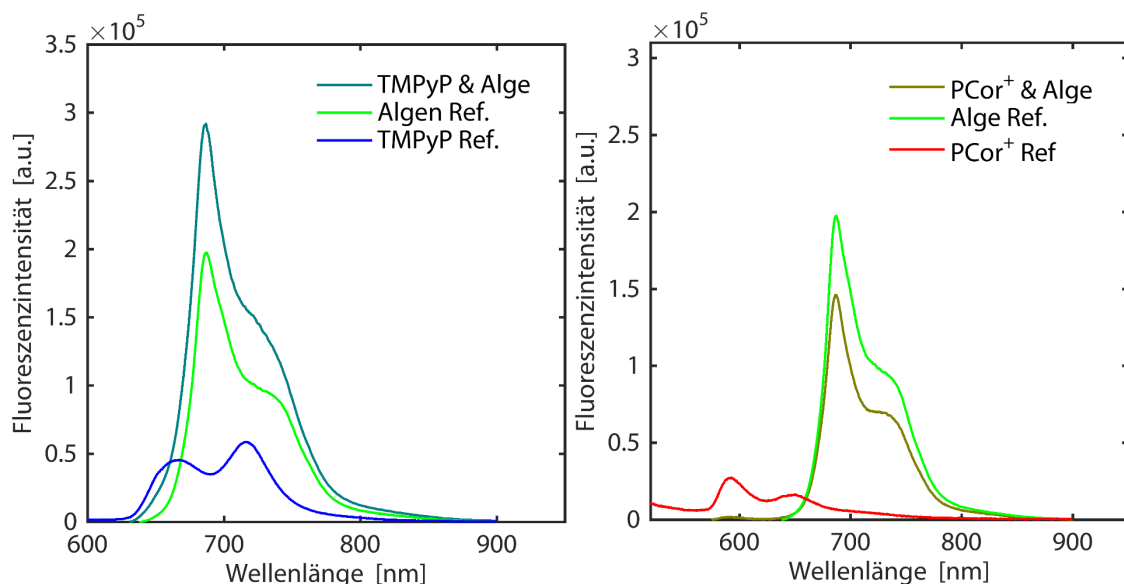


Abbildung 65: Vergleich der Emissionsspektren der Photosensibilisatoren, der Algenreferenz und den Photosensibilisator-Algen Proben.

Für PCor<sup>+</sup> hingegen ist diese spektrale Unterscheidung möglich. Abbildung 66 zeigt die Verteilung der gesamten Fluoreszenzintensität (links), dem für die PCor<sup>+</sup> Fluoreszenz relevanten spektralen Bereich (mitte) und zum Vergleich noch einmal die Verteilung der  $^1\text{O}_2$  Amplitude. Ein Vergleich der drei Verteilungen zeigt eine deutliche Korrelation der Photosensibilisator Fluoreszenz zur  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz, jedoch keine räumliche Korrelation zu den Algen. Es ist also zu vermuten, dass PCor<sup>+</sup> homogen in die Umgebung diffundiert.

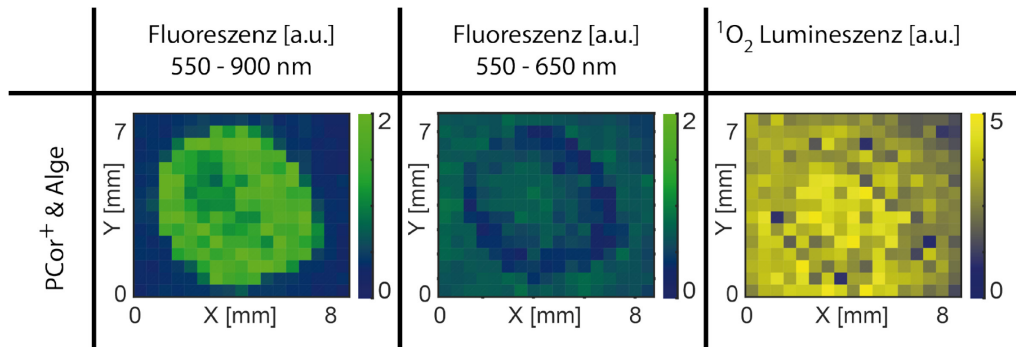


Abbildung 66: Verteilung der Fluoreszenzintensität der PCor<sup>+</sup>-Algen Probe des gesamten gemessenen Spektrums (links) und des spektralen Bereichs der PCor<sup>+</sup> Fluoreszenz (mitte). Ein Vergleich letzterer Verteilung mit der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Amplitude (rechts) zeigt eine deutliche laterale

In diesem Fall ist also der Intensitätsplot der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Amplitude ein besserer Indikator der räumlichen Verteilung des Photosensibilisators als die detektierte Fluoreszenz.

Bei einer genaueren Betrachtung aller NIR Lumineszenzsignale kann zunächst festgestellt werden, dass keine deutliche NIR Lumineszenz an der Algenreferenz detektiert werden konnte. Bei beiden Photosensibilisator-Algen Proben, sowie bei den Photosensibilisator Referenzen wurde ein Störsignal beobachtet, dass in der Amplitude zwischen den Proben variiert. Es konnte aber zufriedenstellend mit einer immer gleichen Kinetik angefitet werden: einer Kohlrauschfunktion der Form:

$$f(t) = A_{\text{Stör}} e^{-\left(\frac{t}{0,2}\right)^{0,6}}$$

Für den Fit der NIR Lumineszenzkinetik aller Pixel des Scanbereichs wurden die Parameter  $\tau_{\text{Stör}} = 0,2$  und  $\beta = 0,6$  fixiert. Da die <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik zufriedenstellend durch ein biexponentielles Modell beschrieben werden konnten, bestand das Fitmodell dementsprechend aus drei Kompartimenten, zwei repräsentieren das biexponentielle Modell der <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik, das dritte Kompartiment ist von den anderen beiden unabhängig und repräsentiert das Störsignal. Die folgende Auswertung der NIR Lumineszenzkinetik wird an der Summe der 5 signalstärksten Pixel vorgenommen.

Das Störsignal konnte auch in den NIR Lumineszenzsignalen der Scans bei 1230 nm gefunden werden. Die NIR Lumineszenzkinetik der TMPyP Referenz und der TMPyP-Algen Probe konnten im Gegensatz zu den PCor<sup>+</sup> Proben allerdings nicht nur durch das Störsignal beschrieben werden. Ein Modell, das neben dem Störsignal eine Photosensibilisator Phosphoreszenz berücksichtigt, konnte zwar die gemessene NIR Lumineszenz gut beschreiben, aber durch zu hohe Konfidenzintervalle konnte eine Photosensibilisator Phosphoreszenz nicht quantifiziert werden. Demnach gibt es zwar

Hinweise auf eine Phosphoreszenz von TMPyP, diese werden aber vom Störsignal so stark überlagert, dass eine Quantifizierung nicht möglich ist.

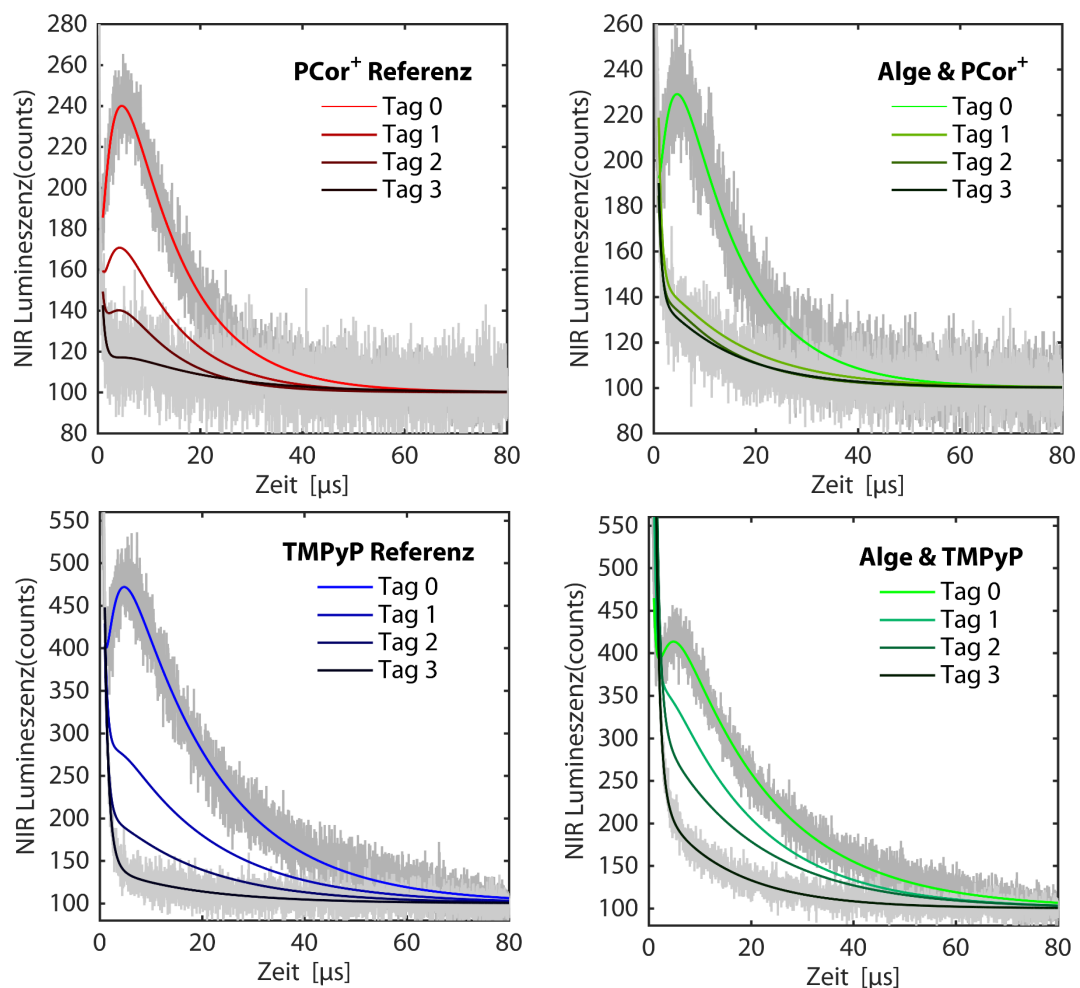


Abbildung 67: Verlauf der NIR Lumineszenzkinetik über den Zeitraum des Experiments. Gezeigt ist jeweils die Summe über die fünf Pixel mit der stärksten  $^1\text{O}_2$  Amplitude. In der oberen Reihe ist der Verlauf der PCor<sup>+</sup> Referenz (links) und der Algen-PCor<sup>+</sup> Probe(rechts) dargestellt, analog dazu sind in der unteren Reihe die Verläufe der Lumineszenzkinetik für TMPyP dargestellt.

Abbildung 67 zeigt die Verläufe der NIR Lumineszenzkinetik über den Zeitraum des Experiments. An allen Proben kann an Tag 0 eine deutliche  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik beobachtet werden. Eine Abnahme der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und einen Anstieg des Störsignals ist sowohl für die Photosensibilisator-Algen Proben als auch für die Photosensibilisator Referenzen zu erkennen. Um diesen Verlauf zu verdeutlichen sind in Abbildung 68 die Verläufe der  $^1\text{O}_2$  Amplitude  $A_0$  und der Amplitude des Störsignals  $A_{\text{Stör}}$  dargestellt. Für beide Photosensibilisatoren ist zu sehen, dass mit der Zeit die  $^1\text{O}_2$  Amplitude stark abnimmt. Für die TMPyP Referenz verschwindet die Amplitude sogar an Tag 3. Dabei sind nur marginale Änderungen zwischen den Photosensibilisator Referenzen und den Algen Proben erkennbar. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Photosensibilisator Referenzen und den Algenproben ist im Verlauf der Amplitude des Störsignals



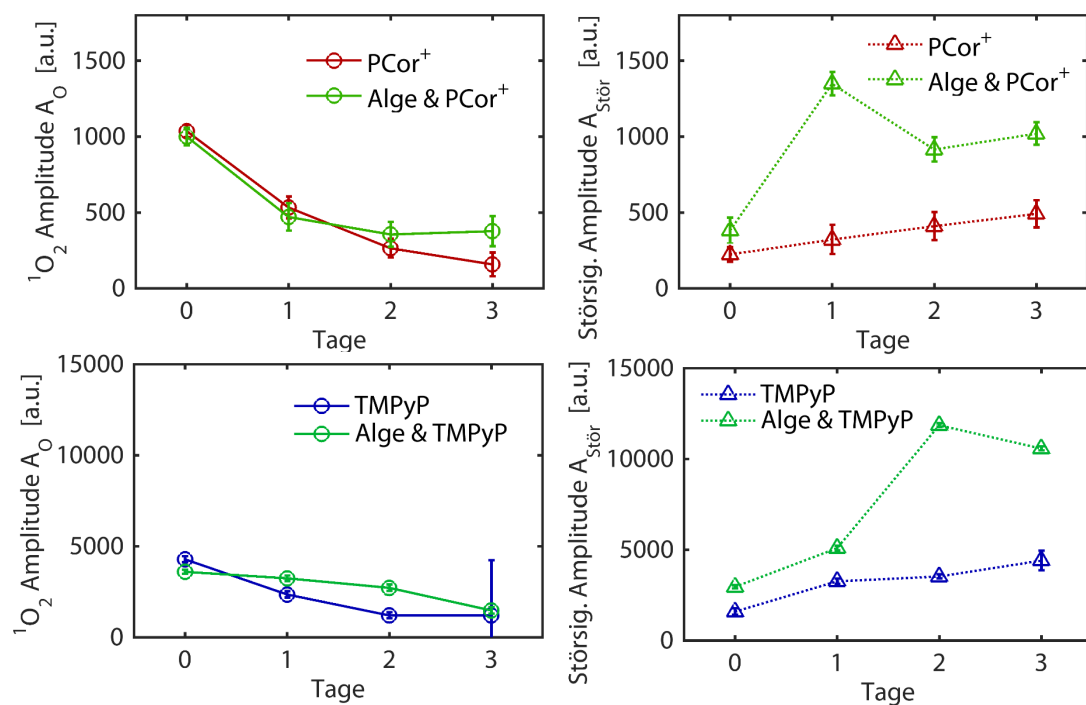


Abbildung 68: Verläufe der  $^1\text{O}_2$  Amplitude  $A_0$  (links) und der Amplitude des Störsignals  $A_{\text{Stör}}$  (rechts) für die  $\text{PCor}^+$  (oben) und TMPyP Proben (unten). Für beide Photosensibilisatoren ist eine Abnahme der  $^1\text{O}_2$  Amplitude und eine Zunahme der Amplitude des Störsignals über die Zeit zu erkennen.

erkennbar. Bereits an Tag 1, also einen Tag nach der Probenpräparation, ist die Amplitude des Störsignals für beide Photosensibilisator-Algen Proben deutlich stärker als die des  $^1\text{O}_2$ . Aber auch für die Photosensibilisator Referenzen kann eine Zunahme des Störsignals beobachtet werden, wenn auch deutlich abgeschwächer. An dieser Stelle ist noch einmal darauf hinzuweisen, dass an der Algen Referenz dieses Störsignal nicht detektiert werden konnte.

Um die Verläufe der NIR Lumineszenzkinetik über die Zeit im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit den Experimenten an anderen Mikroorganismen vergleichen zu können, wird der Verlauf der ermittelten An- und Abklingzeiten diskutiert. Diese Verläufe sind in Abbildung 69 dargestellt. In Anbetracht des deutlichen Störsignals lässt sich festhalten, dass  $\text{PCor}^+$  eine Abklingzeit von etwa 10 bis 15  $\mu\text{s}$  sowohl für die Referenz als auch für die Algen Probe aufweist. TMPyP zeigt eine ähnliche, jedoch höhere Abklingzeit von etwa 16 bis 19  $\mu\text{s}$ . Die Anklingzeiten liegen alle in einem Bereich von 2  $\mu\text{s}$ .

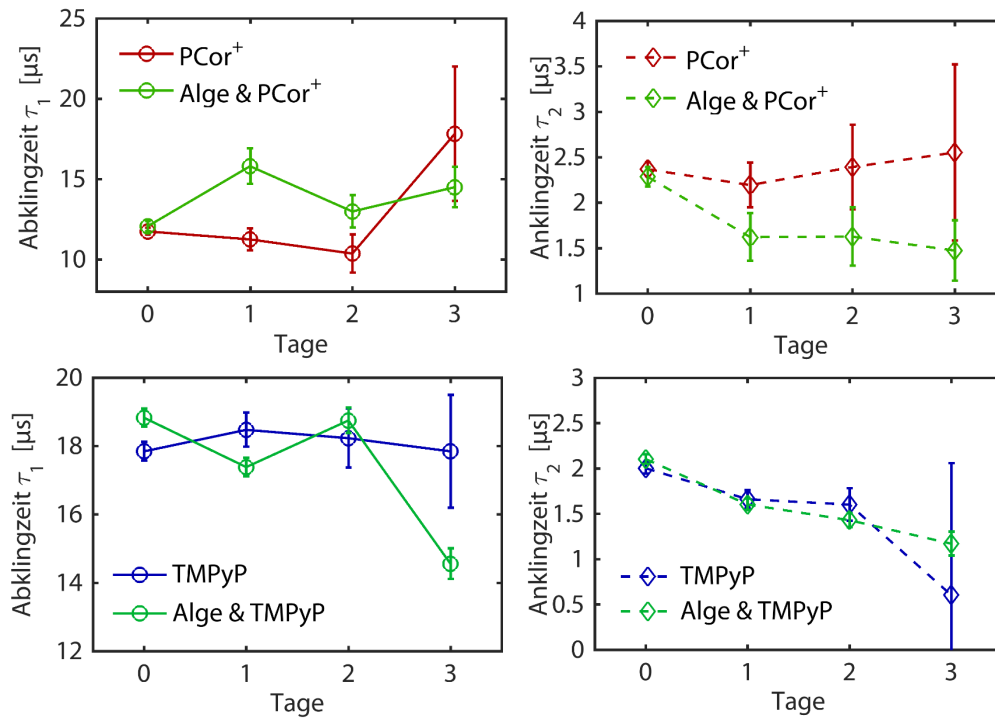


Abbildung 69: Verläufe der Abklingzeit  $\tau_1$  (links) und der Anklingzeit  $\tau_2$  (rechts) für die PCor<sup>+</sup> (oben) und TMPyP Proben (unten).

### 4.3.3 Diskussion

Dieses Experiment zeigt, dass auch an Grünalgen die Lumineszenz von photosensibilisiert generiertem  $^1\text{O}_2$  über mehrere Tage detektiert werden kann. Eine deutliche Änderung zwischen den jeweiligen Photosensibilisator Referenzen und der Photosensibilisator-Algen Proben ist jedoch nur im Störsignal zu erkennen. Dieses Störsignal kann jedoch nicht an der Grünalgenreferenz detektiert werden. Die Amplitude des Störsignals zeigt eine steigende Tendenz, sowohl für die Photosensibilisator-Algen Proben als auch für die Photosensibilisator Referenzen. Dabei ist die Amplitude für Photosensibilisator-Algen Proben deutlich höher. Als Ursache für dieses Störsignal ist eine Interaktion der Photosensibilisatoren sowohl mit dem Agar, als auch mit den Algen denkbar.

Durch Aufnahmen mit einem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscope*) an Proben, die den hier untersuchten Proben sehr ähnlich sind, ist bekannt, dass PCor<sup>+</sup> und TMPyP verschieden an den Algen lokalisiert sind [37]. Allerdings ist eine Abhängigkeit der Lokalisierung der Photosensibilisator an oder in den Zellen zu der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik derzeit nicht möglich.

## **4.4 Zusammenfassung und Diskussion der Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff Lumineszenzkinetik an verschiedenen Mikroorganismen auf Nährböden**

An allen vier untersuchten Mikroorganismen gelang der direkte Nachweis von photosensibilisiert generiertem  $^1\text{O}_2$  über die Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz über mehrere Tage. Sowohl für das untersuchte Bakterium wie auch für die beiden Pilze konnten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik und dem Wachstum der Mikroorganismen gefunden werden: Eine fallende Tendenz der TMPyP-Triplettlebensdauer mit steigender Konzentration der Mikroorganismen.

Biologische Systeme unter Laborbedingungen unterliegen immer starken Schwankungen im Wachstum. Deshalb kann ein realistischer Vertrauensbereich der Kinetikparameter nur durch die Statistik über viele gleiche Proben bestimmt werden. Eine Interpretation der Ergebnisse über die Betrachtung von Tendenzen hinaus muss daher ohne weiterführende Untersuchungen sehr konservativ erfolgen.

Zunächst konnte eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Photosensibilisator Fluoreszenz und der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz beobachtet werden. Sowohl an Pilzen, als auch an *E. coli* zeigte sich, dass bei hoher Konzentration der Mikroorganismen zwar eine Photosensibilisator Fluoreszenz, aber verhältnismäßig deutlich schwächere  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz detektiert werden kann. Diese Beobachtung deutet auf starkes Quenching des  $^1\text{O}_2$  bei hoher Konzentration der Mikroorganismen hin. Trotz des starken Quenchings konnte eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik über mehrere Tage, und damit für den gesamten PDI-relevanten Zeitraum, bestimmt werden.

Die Betrachtung der Intensitätsplots zeigte, dass ein deutlicher Unterschied in der lokalen Verteilung der beiden untersuchten Photosensibilisatoren besteht: TMPyP verlässt im gesamten Zeitraum, in dem TMPyP Fluoreszenz oder  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz detektiert werden kann, kaum den Bereich des Filterpapiers. PCor<sup>+</sup> hingegen zeigt bereits eine Stunde nach der Probenpräparation leichte Anzeichen einer Diffusion aus dem Filterpapier in die Umgebung. Einen Tag nach der Probenpräparation ist der Photosensibilisator beinahe gleichverteilt über den gesamten Scanbereich diffundiert. Ein Vergleich des Diffusionsverhaltens von PCor<sup>+</sup> an verschiedenen Mikroorganismen zeigt Unterschiede zwischen den Mikroorganismen. Während an Algen eine Gleichverteilung des PCor<sup>+</sup> beobachtet werden kann, sieht man an Pilzen zwar an Tag 1 eine beinahe Gleichverteilung des PCor<sup>+</sup>, nach Tag 1 zeigt sich aber eine deutliche Korrelation zum Pilzbewuchs. An *E. coli* ist das Gegenteil zu beobachten: PCor<sup>+</sup> ist über den gesamten Scanbereich

verteilt, im Bereich hoher Bakteriendichte ist jedoch keine Lumineszenz, weder PCor<sup>+</sup> Fluoreszenz noch <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz zu erkennen.

Die Ursache für dieses unterschiedliche Diffusionsverhalten ist entweder eine stärkere Wechselwirkung des TMPyP mit dem Filterpapier als PCor<sup>+</sup>, oder eine überdurchschnittlich starke Diffusion von PCor<sup>+</sup> in den Agar. Ein Vergleich mit anderen Photosensibilisatoren ist nur bedingt möglich, da Lumineszenz Untersuchungen, wie sie hier durchgeführt wurde, bisher nur für die beiden vorgestellten Photosensibilisatoren durchgeführt wurde. Beobachtungen der Färbung der Filterpapiere bei Phototoxizitäts-Handversuchen deuten aber darauf hin, dass viele untersuchte Photosensibilisator über einen längeren Zeitraum das Filterpapier nur geringfügig verlassen. Demnach zeigt PCor<sup>+</sup> eher eine überdurchschnittliche Diffusion in den Agar.

In allen drei Experimenten wurde in der NIR Lumineszenzkinetik ein deutliches Störsignal detektiert. Die Kinetik des Störsignals ist immer sehr ähnlich, jedoch nicht gleich. Durch die Detektion des Störsignals bei 1230 nm kann eine <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenz mit sehr kurzer Kinetik ausgeschlossen werden. Die Hypothese, dass sich die Kinetik des Störsignals nur in der Amplitude ändert, ist Grundlage, um auch bei sehr geringem Signal-Rausch-Verhältnis noch eine <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Lumineszenzkinetik zu bestimmen. Sie wird gestützt durch Beobachtungen an den Mikroorganismen Referenzen des *E. coli*-, *T. rubrum* und *S. brevicaulis*-Experiments und der Kinetik der NIR Lumineszenz, die bei 1230 nm detektiert wurde.

Das Störsignal konnte in allen Experimenten durch eine Kohlrauschfunktion beschrieben werden, dabei waren die Zeiten  $\tau_{\text{Stör}}$  im Bereich von 0,1 bis 0,3  $\mu\text{s}$  und die Werte für  $\beta$  lagen zwischen 0,3 und 0,7. Diese Werte deuten auf eine breite Ratenverteilung von Prozessen hin, die deutlich schneller ablaufen als die Interaktion von Photosensibilisator und O<sub>2</sub> beziehungsweise von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> und der Umgebung. Demnach ist die Ursache des Störsignals eher vielfältig, sodass sich kaum eine einzige Quelle als Hauptursache feststellen lässt. Die Beobachtungen aus den hier gezeigten Experimenten lassen aber die Hypothese zu, dass Mono- und Polysaccharide und die Interaktion von Photosensibilisatoren mit Mono- oder Polysacchariden das Störsignal hervorrufen können. Diese Hypothese stützt sich auf folgende Beobachtungen:

- Auf den Referenzen der Mikroorganismen wird auf BBM Agar ohne Photosensibilisator kein Störsignal beobachtet, auf M9-Agar jedoch schon. Auch wenn Agarose in jedem Fall vorhanden ist, sind in BBM keine Mono- oder Polysaccharide enthalten, M9 hingegen besteht zu 20 % aus Monosacchariden.
- In den Experimenten an *E. coli*, *T. rubrum* und *S. brevicaulis* wurde ein photodynamischer Effekt so weit wie möglich unterbunden. Die untersuchte Alge braucht zum Wachstum

einen Tag-Nacht-Rhythmus. Demnach wurden Zellen während der Beleuchtungsphasen inaktiviert. Das wiederum führte zu einem Anstieg der Konzentration freier Polysaccharide, da sich Fragmente der Zellwände inaktivierter Zellen verteilen. Das würde den Anstieg der Störsignalamplitude im Experiment an Algen über dessen Dauer erklären.

- Am Bakterium *E. coli* und beiden Pilzen wurde das Störsignal über den gesamten Zeitraum mit fast konstanter Amplitude detektiert. Auch die Referenzen der Mikroorganismen ohne Photosensibilisator und die Photosensibilisator Referenzen zeigten dieses Störsignal, jedoch mit geringerer Amplitude. An Algen konnte das Störsignal jedoch nur an Proben mit Photosensibilisator detektiert werden.

Alle Untersuchungen zeigen eine  $^1\text{O}_2$  Lebensdauer, die im Bereich von etwa 1,5 bis 3  $\mu\text{s}$  liegt und sich über mehrere Tage nur marginal ändert. Durch das Störsignal kann jedoch die Anklingzeit nur bedingt bestimmt werden. Deshalb müssen leichte Tendenzen, wie sie zum Beispiel für PCor<sup>+</sup> an *E. coli* und Algen beobachtet werden können, ignoriert werden, bis sie durch weitere Untersuchungen bestätigt werden können. Die  $^1\text{O}_2$  Lebensdauer ist kürzer als in Wasser (3,7  $\mu\text{s}$  [30]), was auf effizientes Quenching von  $^1\text{O}_2$  hindeutet. Die hier untersuchten Systeme bestehen zum Großteil aus Biomolekülen, die unter anderem durch viele O-H Verbindungen effiziente  $^1\text{O}_2$  Quencher sind. Daher ist eine kurze  $^1\text{O}_2$  Lebensdauer durch eine hohe Quencherkonzentration plausibel.

Die Triplettlebensdauer zeigt deutliche Unterschiede für beide Photosensibilisatoren. Für PCor<sup>+</sup> kann eine Triplettlebensdauer von 5 bis 10  $\mu\text{s}$  bestimmt werden. Für TMPyP ist sie mit 15 bis 25  $\mu\text{s}$  deutlich länger. Für das gram<sup>-</sup> Bakterium *E. coli*, den Dermatophyten *T. rubrum* und den Schimmelpilz *S. brevicaulis* können Hinweise auf eine Abhängigkeit der Triplettlebensdauer des TMPyP zur Konzentration des Mikroorganismus gefunden werden: Eine steigende Tendenz der Abklingzeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik.

Die phototoxische Wirkung beider Photosensibilisatoren auf die hier untersuchten Mikroorganismen ist noch nicht für alle Mikroorganismen systematisch untersucht. Aus Handversuchen ist aber bekannt, dass beide Photosensibilisatoren auf alle hier vorgestellten Mikroorganismen phototoxisch wirken. Demnach kommt es durchaus zu einer Akkumulation der Photosensibilisatoren an der Zellwand oder in der Zelle. Eine Abhängigkeit der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik zur Konzentration der Mikroorganismen wurde nur für die Triplettlebensdauer der TMPyP in einer fallenden Tendenz gefunden. Die Auswirkungen der Akkumulation der Photosensibilisator Moleküle an der Zellwand auf die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik sind also entweder sehr gering, oder die Kinetik der detektierten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz wird von freien

Photosensibilisatoren aus dem Filterpapier dominiert, sodass die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik von Photosensibilisatoren an oder in Zellen überlagert ist.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit gelang erstmalig der direkte Nachweis von  $^1\text{O}_2$  an verschiedenen oberflächlich kultivierten Mikroorganismen mittels orts- und zeitaufgelöster Detektion der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz. Es wurde ein entsprechender Messplatz konzipiert, aufgebaut und getestet. Durch eine Reihe von Untersuchungen zur Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf der Oberfläche von Nährböden konnten optimale Bedingungen für  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz Untersuchungen an kultivierten Oberflächen bestimmt werden.

An vier relevanten Mikroorganismen, dem Bakterium *Escherichia coli*, dem Dermatophyten *Trichophyton rubrum*, dem Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* und der Alge *Chlorella fusca* var. *vacuolata*, konnte eine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik über den PDI-relevanten Zeitraum von mehreren Tagen bestimmt werden. Darüber hinaus lässt das Signal-Rausch-Verhältnis der detektierten  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz eine aussagekräftige Analyse der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik an allen vier Mikroorganismen zu. Erste Hinweise auf eine Korrelation der  $^1\text{O}_2$  Kinetikparameter zum Wachstum der Mikroorganismen konnten gefunden werden, die jedoch einer weiteren Verifizierung bedürfen.

### Messplatz zur orts- und zeitaufgelösten Detektion von Singulett-Sauerstoff Lumineszenz auf Oberflächen

Für die Untersuchungen wurde ein spezieller Messplatz zur orts- und zeitaufgelösten Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf Oberflächen geplant, konstruiert, charakterisiert und getestet. Dieser Messplatz ermöglicht die die hochsensible, zeitaufgelöste Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und die Detektion von Fluoreszenz auf nahezu jeder Oberfläche. Das Abrastern von Flächen von 0,2 x 0,2 mm bis 250 x 250 mm ermöglicht Scans der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz und der Fluoreszenz.

Nach Abschluss des Aufbaus wurde der Messplatz parallel zu den hier vorgestellten Experimenten auch anderweitig bereits erfolgreich eingesetzt. So wurde die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an verschiedenen funktionalisierten Oberflächen und verschiedenen biologischen Proben, wie zum Beispiel an Fingernägeln, orts- und zeitaufgelöst detektiert. Dabei zeigte sich, dass auf verschiedenen Oberflächen verlässliche Lumineszenzscans durchgeführt werden können und der Umgang mit dem Messplatz mit geringem Zeitaufwand zu erlernen ist. Zudem konnte die Langzeitstabilität des Messplatzes und der Software durch kontinuierliche Benutzung über mehrere Tage sichergestellt werden.

Die hier vorgestellten Experimente haben gezeigt, dass auf der Oberfläche biologischer Proben die Kinetik der NIR Lumineszenz sehr komplex ist. Um die Parameter der Kinetik präziser bestimmen zu können, sollte bei zukünftigen Optimierungen des Messplatzes die Maximierung des Signal-

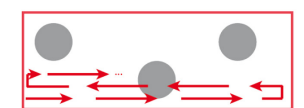
Rausch-Verhältnisses im Vordergrund stehen. Neben der Erprobung möglicher neuer Detektoren, gelingt dies durch die Optimierung des Lichtwegs, die Maximierung der Sammeleffizienz und die Optimierung der Anregungs-Wellenlänge und -Intensität.

Solange ein Mindestabstand von sechs bis sieben Millimetern zur Probenoberfläche notwendig ist, kann eine Veränderung der Detektionsoptik oder der Faser nur geringe Verbesserungen der Sensitivität des Messplatzes bringen. Ein Punkt zukünftiger Optimierung könnte eine stärkere Anregungslichtquelle sein. Die Anregungswellenlänge erwies sich als geeignet für alle bisher untersuchten Photosensibilisatoren. Eine höhere Anregungsenergie würde jedoch das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern. Bei zu hoher Anregungsenergie besteht zwar die Gefahr, dass während der Messung phototoxische Effekte an biologischen Proben auftreten, die Erfahrungen dieser Arbeit zeigen aber, dass wahrscheinlich auch bei Anregungsenergien von  $0,5\ \mu\text{J}$  bis  $1\ \mu\text{J}$  kein signifikanter phototoxischer Effekt auftreten würde. Das Signal-Rausch-Verhältnis wäre aber größer.

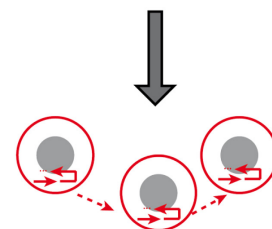
Die entwickelte Steuersoftware hat sich während der Durchführung der hier vorgestellten Experimente als zuverlässig, bedienerfreundlich und stabil erwiesen. Eine Erweiterung der Steuersoftware wäre allerdings für zukünftige Anwendungen vorteilhaft:

Durch die hohe Variabilität bei biologischen Proben ist eine Messung von mehreren, gleichen Proben wünschenswert. Diese Messung würde durch eine Erweiterung der Software um die Definition komplexerer Scan-Pfade deutlich erleichtert werden. Derzeit können nur rechteckige Flächen abgerastert werden. Eine Erweiterung der Software um komplexere Pfade abzurastern sollte deshalb implementiert werden (siehe Abbildung 70). Dies würde die Messdauer reduzieren, außerdem wäre eine Verwendung ähnlich einem Plate-Reader möglich. Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten mit mehreren gleichen Proben könnte die Aussagekraft von NIR Kinetikparametern durch die Statistik über diese Proben deutlich erhöht werden.

Die hier präsentierte Methode der Datenauswertung erlaubt eine unkomplizierte Modellierung komplexer Kinetik und eine effiziente Anpassung des Kinetikmodells an die detektierte NIR Lumineszenz eines jeden Pixels.



Fläche und Pfad des Scans derzeit



Fläche und Pfad des Scans optimiert

*Abbildung 70: Eine Optimierung der Software um auch komplexere Pfade ab zu scannen würde die Messdauer eines Scans verringern.*



Allerdings kann die Datenauswertung in verschiedenen Bereiche noch optimiert werden. In dieser Arbeit wurde das aufgestellte Kinetikmodell durch eine Routine gemäß der Methode der kleinsten Quadrate angepasst. Zusätzlich sollte eine Anpassung gemäß der Maximum-Likelihood-Methode implementiert werden, da diese für geringe Zählraten geeigneter ist als die Methode der kleinsten Quadrate [147,163,164]. Allerdings können beide Anpassungsmethoden systematische Abweichungen der angepassten Parameter bei geringen Zählraten zeigen [163]. Zudem ist der Unterschied der angepassten Parameter meist deutlich kleiner als ihre Konfidenzintervalle. Aus diesen Gründen ist eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses deutlich wichtiger als die Optimierung der Datenauswertung auf geringe Zählraten.

### **Detektion von Singulett-Sauerstoff Lumineszenz auf Nährböden**

Es wurde gezeigt, dass eine orts- und zeitaufgelöste Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz auf der Oberfläche von Nährböden möglich ist. Zudem konnten qualitative Quenchingeigenschaften für verschiedene Bestandteile der untersuchten Nährböden bestimmt werden. In Nährböden, die Proteine enthalten, zeigt sich besonders starkes Quenching der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz. Auch Nährböden mit Saccharinen zeigen deutliches Quenching der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz, jedoch ist es geringer als bei Nährböden mit Proteinen. Für zukünftige Experimente an Mikroorganismen sollte deshalb ein Nährmedium mit einem möglichst geringen Anteil an Proteinen und Saccharinen gewählt werden.

Bei Messungen an versiegelten biologischen Proben führt die Bildung von Wassertropfen am Deckel der Petrischalen zu starken Streueffekten. Eine Möglichkeit um diesen Effekt zu unterbinden ist eine sehr dünne Schicht weißes Vaseline auf der Innenseite des Deckels. Allerdings müssen dafür einige Voruntersuchungen durchgeführt werden. Auch wenn weißes Vaseline chemisch sehr reaktionsträge ist, muss ein möglicher Einfluss auf den jeweiligen Mikroorganismus ausgeschlossen werden, zudem müssen die optischen Eigenschaften, insbesondere die Absorptions- und Emissionseigenschaften charakterisiert werden.

### **Orts- und zeitaufgelöste Detektion von Singulett-Sauerstoff Lumineszenz an verschiedenen Mikroorganismen auf Nährböden**

An dem Bakterium *Escherichia coli*, dem Dermatophyten *Trichophyton rubrum*, dem Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* und der Alge *Chlorella fusca* var. *vacuolata* gelang erstmalig die orts- und zeitaufgelöste Detektion von photosensibilisiert generiertem  $^1\text{O}_2$ . Die Kinetik der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz konnte über einen Zeitraum von mehreren Tagen, und damit über den für die PDI-relevanten Zeitraum, bestimmt werden.

Die Experimente an Mikroorganismen in dieser Arbeit sind darauf ausgerichtet, Grundlagen zur orts- und zeitaufgelösten Detektion von  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz an der Oberfläche kultivierter Mikroorganismen auf Nährböden zu schaffen.

Um Untersuchungen an Mikroorganismen verschiedener Konzentrationen und in verschiedenen Wachstumsphasen durchführen zu können wurde ein Photodynamischer Effekt während des Experiments weitestgehend unterbunden. Der nächste Schritt ist die vergleichende Untersuchung von beleuchteten und unbeleuchteten Proben. Ein Vergleich der Parameter der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik von beleuchteten Proben mit Dunkelreferenzen könnte den Einfluss des photodynamischen Effekts auf die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik aufdecken.

Durch das Abrastern der Probe konnten Intensitätsplots der Photosensibilisator-Fluoreszenz und der  $^1\text{O}_2$  Amplitude erstellt werden. Ein Vergleich von Fotos der Proben mit diesen Intensitätsplots zeigte Unterschiede im Diffusionsverhalten der beiden verwendeten Photosensibilisatoren. Zudem konnte eine qualitative Abhängigkeit von Photosensibilisator-Fluoreszenz und  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz von der Konzentration der Mikroorganismen gefunden werden. Das Quenching der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz durch Mikroorganismen wurde in Bereichen deutlich, in denen zwar Photosensibilisator Fluoreszenz, aber keine  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz beobachtet werden konnte.

Der Verlauf der  $^1\text{O}_2$  Amplituden zeigt deutlich, dass die  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz bei steigender Konzentration von Mikroorganismen geringer wird. Eine Bestimmung der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik ist jedoch über mehrere Tage, und damit über den gesamten Zeitraum, der für die PDI relevant ist, möglich.

Aufgrund der hohen Variabilität biologischer Proben zeigen die ermittelten Kinetikparameter starke Schwankungen. Um Kinetikparameter der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenz präziser bestimmen zu können, sollte deshalb in zukünftigen Experimenten über viele, gleiche Proben gemittelt werden. Trotz der starken Schwankungen konnte eine fallende Tendenz der Triplettlebensdauer von TMPyP bei steigender Bakterien- und Pilzkonzentration gefunden werden. Auch wenn diese Abhängigkeit noch verifiziert werden muss, konnte damit ein erster Hinweis auf eine Korrelation der  $^1\text{O}_2$  Lumineszenzkinetik mit dem Wachstum verschiedener Mikroorganismen auf Oberflächen gefunden werden.

# Abkürzungen

$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
CFU	<i>Colony forming units</i> , koloniebildende Einheiten
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
FGV	Funktionale Globale Variable
FP	Filterpapier
gram <sup>+</sup> gram <sup>-</sup>	grampositiv gramnegativ
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> , höchstes besetztes Molekülorbital
ISC	<i>Intersystem Crossing</i> , Interkombination
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> , niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
NIR	Nahinfrarot
O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	Polycaprolacton
PCor <sup>+</sup>	5,10,15-tris-(1-methylpyridinium-2-yl)corrolato-(trans-dihydroxo)phosphorus(V)
PDI	Photodynamische Inaktivierung
PDT	Photodynamische Therapie
PEG	<i>Polyethylenglycol</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
<i>S. brevicaulis</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
SOSG	<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate)
WHO	<i>World Health Organization</i> , Welt Gesundheitsorganisation

## Literatur

- [1] W.H. Organization, Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance: Global Report on Surveillance, World Health Organization, Geneva, 2014.
- [2] World Health Organization, Global action plan on antimicrobial resistance, World Health Organization, Geneva, 2015.
- [3] S. Levy, Microbial Resistance to Antibiotics, *The Lancet* 320 (8289) (1982) 83–88.
- [4] H.C. Neu, The Crisis in Antibiotic Resistance, *Science* 257 (5073) (1992) 1064–1073.
- [5] E.D. Brown, G.D. Wright, Antibacterial drug discovery in the resistance era, *Nature* 529 (7586) (2016) 336–343.
- [6] S.B. Levy, B. Marshall, Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses, *Nature medicine* 10 (12 Suppl) (2004) S122–9.
- [7] V.M. D'Costa, K.M. McGrann, D.W. Hughes, G.D. Wright, Sampling the antibiotic resistome, *Science* 311 (5759) (2006) 374–377.
- [8] F.C. Tenover, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *The American journal of medicine* 119 (6 Suppl 1) (2006) S3–10; discussion S62–70.
- [9] S.R. Norrby, C.E. Nord, R. Finch, Lack of development of new antimicrobial drugs: A potential serious threat to public health, *The Lancet Infectious Diseases* 5 (2) (2005) 115–119.
- [10] E. Scott, S.F. Bloomfield, The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils, *Journal of Applied Bacteriology* 68 (3) (1990) 271–278.
- [11] T. Maisch, Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria, *Photochemical & photobiological sciences Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 14 (8) (2015) 1518–1526.
- [12] D.A. Goldmann, Strategies to Prevent and Control the Emergence and Spread of Antimicrobial-Resistant Microorganisms in Hospitals, *JAMA* 275 (3) (1996) 234.
- [13] M.G. Petri, J. König, H.P. Moecke, H.J. Gramm, H. Barkow, P. Kujath, R. Denhart, H. Schäfer, N. Meyer, P. Kalmar, P. Thülig, J. Müller, H. Lode, Epidemiology of invasive mycosis in ICU patients: A prospective multicenter study in 435 non-neutropenic patients, *Intensive Care Medicine* 23 (3) (1997) 317–325.
- [14] M. Thianprasit, U. Youngchaiyud, P. Suthipinittharm, Protothecosis: A Report of Two Cases: Protothekose/Bericht über zwei Fälle, *Mycoses* 26 (9) (1983) 455–461.
- [15] T. Warscheid, J. Braams, Biodeterioration of stone: A review, *International Biodeterioration & Biodegradation* 46 (4) (2000) 343–368.
- [16] R.H. Kellogg, "La Pression barométrique": Paul Bert's hypoxia theory and its critics, *Respiration physiology* 34 (1) (1978) 1–28.

- [17] N. Haugaard, Cellular mechanisms of oxygen toxicity, *Physiological reviews* 48 (2) (1968) 311–373.
- [18] H. von Tappeiner, A. Jodlbauer, Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien, *Dtsch Arch Klin Med* 80 (1904) 427–487.
- [19] R.-M. Szeimies, Geschichte der Photodynamischen Therapie, *Aktuelle Derm* 31 (5) (2005) 193–197.
- [20] H. v. Tappeiner, Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe), *Ergebnisse der Physiologie* 8 (1) (1909) 698–741.
- [21] C. Ledoux-Lebard, Action de la Lumière sur la Toxicité de l'Éosine: et de quelques autres Substances, *Annales de l'Institut Pasteur* (16) (1902) 587–594.
- [22] J.N. Welsh, M.H. Adams, Photodynamic inactivation of bacteriophage, *Journal of Bacteriology* 68 (1) (1954) 122–127.
- [23] C.E. Clifton, Photodynamic Action of Certain Dyes on the Inactivation of Staphylococcus Bacteriophage, *Experimental Biology and Medicine* 28 (7) (1931) 745–746.
- [24] J.R. Perdrau, C. Todd, The Photodynamic Action of Methylene Blue on Bacteriophage, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 112 (777) (1933) 277–287.
- [25] L. Huang, T. Dai, M.R. Hamblin, Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 635 (2010) 155–173.
- [26] J.S. Bellin, L. Lutwick, B. Jonas, Effects of photodynamic action on *E. coli*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 132 (1) (1969) 157–164.
- [27] M.R. Hamblin, Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes, *Current opinion in microbiology* 33 (2016) 67–73.
- [28] B. Röder, Einführung in die molekulare Photobiophysik, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, 1999.
- [29] R. Polansky, M. Haas, A. Heschl, G. Wimmer, Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis, *Journal of Clinical Periodontology* 36 (7) (2009) 575–580.
- [30] S. Nonell, C. Flors, Singlet Oxygen: Applications in biosciences and nanosciences: Volume 2, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.
- [31] Y. Arenas, S. Monro, G. Shi, A. Mandel, S. McFarland, L. Lilge, Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Ru(II)-based type I/type II photosensitizers, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 10 (4) (2013) 615–625.
- [32] E. Feese, R.A. Ghiladi, Highly efficient in vitro photodynamic inactivation of *Mycobacterium smegmatis*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64 (4) (2009) 782–785.

- [33] R. Bonnett, M.A. Krysteva, I.G. Lalov, S.V. Artarsky, Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan, *Water Research* 40 (6) (2006) 1269–1275.
- [34] M. Jemli, Z. Alouini, S. Sabbahi, M. Gueddari, Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers, *J. Environ. Monitor.* 4 (4) (2002) 511–516.
- [35] C.M.B. Carvalho, A.T.P.C. Gomes, S.C.D. Fernandes, A.C.B. Prata, M.A. Almeida, M.A. Cunha, J.P.C. Tomé, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, A.C. Tomé, J.A.S. Cavaleiro, Z. Lin, J.P. Rainho, J. Rocha, Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial beta-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 88 (2-3) (2007) 112–118.
- [36] J. Pohl, I. Saltsman, A. Mahammed, Z. Gross, B. Röder, Inhibition of green algae growth by corrole-based photosensitizers, *J. Appl. Microbiol.* 118 (2) (2015) 305–312.
- [37] T. Bornhütter, J. Pohl, C. Fischer, I. Saltsman, A. Mahammed, Z. Gross, B. Röder, Development of Singlet Oxygen Luminescence Kinetics during the Photodynamic Inactivation of Green Algae, *Molecules (Basel, Switzerland)* 21 (4) (2016).
- [38] H. Shi, R. Magaye, V. Castranova, J. Zhao, Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data, *Part Fibre Toxicol* 10 (1) (2013) 15.
- [39] I.M. Urrutia-Ortega, L.G. Garduno-Balderas, N.L. Delgado-Buenrostro, V. Freyre-Fonseca, J.O. Flores-Flores, A. Gonzalez-Robles, J. Pedraza-Chaverri, R. Hernandez-Pando, M. Rodriguez-Sosa, S. Leon-Cabrera, L.I. Terrazas, H. van Loveren, Y.I. Chirino, Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model, *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 93 (2016) 20–31.
- [40] R.J. Watts, S. Kong, M.P. Orr, G.C. Miller, B.E. Henry, Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent, *Water Research* 29 (1) (1995) 95–100.
- [41] S. Veerachamy, T. Yarlagadda, G. Manivasagam, P.K. Yarlagadda, Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* 228 (10) (2014) 1083–1099.
- [42] K. Hashimoto, H. Irie, A. Fujishima, TiO<sub>2</sub> Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects, *Jpn. J. Appl. Phys.* 44 (12) (2005) 8269–8285.
- [43] S. Anurag, K. Jatinder, N. Ajay, Photocatalytic Application of Titanium dioxide in architectural concrete: A review, *International Journal of Scientific Research & Chemical Engineering* 1 (1) (2015).
- [44] L. Armand, A. Tarantini, D. Beal, M. Biola-Clier, L. Bobyk, S. Sorieul, K. Pernet-Gallay, C. Marie-Desvergne, I. Lynch, N. Herlin-Boime, M. Carriere, Long-term exposure of A549 cells to

titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents, *Nanotoxicology* 10 (7) (2016) 913–923.

- [45] International Agency for Research on Cancer, Weltgesundheitsorganisation, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 93, Carbon black, titanium dioxide, and talc: This publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 7 - 14 Februar 2006, WHO, Lyon, 2010.
- [46] M.B. Heringa, L. Geraets, J.C.H. van Eijkeren, R.J. Vandebruiel, W.H. de Jong, A.G. Oomen, Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations, *Nanotoxicology* 10 (10) (2016) 1515–1525.
- [47] C. Wright, A.K.V. Iyer, L. Wang, N. Wu, J.S. Yakisich, Y. Rojanasakul, N. Azad, Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes, *Drug and chemical toxicology* 40 (1) (2017) 90–100.
- [48] ANSES (on behalf of the French MSCA), CLH Report: Proposal for Harmonised Classification and Labelling Substance Name: Titanium Dioxide.
- [49] Submitted CLH proposals - ECHA, available at <https://echa.europa.eu/de/registry-of-submitted-harmonised-classification-and-labelling-intentions/-/substance-rev/11608/term> (accessed on July 26, 2017).
- [50] Annegret Preuß, Photosensibilisatoren in der PDI. mündlich, Berlin, 2017.
- [51] J. Schlothauer, Zeitaufgelöster Nachweis von Singulett-Sauerstoff. Diplomarbeit, Berlin, 2009.
- [52] J. Schlothauer, B. Röder, S. Hackbarth, J. Lademann, Proc. SPIE 7551, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XIX, (2010) 755106.
- [53] J.C. Schlothauer, J. Falckenhayn, T. Perna, S. Hackbarth, B. Röder, Luminescence investigation of photosensitizer distribution in skin: correlation of singlet oxygen kinetics with the microarchitecture of the epidermis, *Journal of biomedical optics* 18 (11) (2013) 115001.
- [54] X. Ragàs, M. Agut, S. Nonell, Singlet oxygen in Escherichia coli: New insights for antimicrobial photodynamic therapy, *Free radical biology & medicine* 49 (5) (2010) 770–776.
- [55] T. Maisch, Photodynamische Inaktivierung von Bakterien, *BIOspektrum* (7) (2007) 751–753.
- [56] A. Müller, Photodynamische Inaktivierung eines gram-negativen Modellbakteriums – Korrelation von Singulett-Sauerstoff-Kinetik und Phototoxizität. Masterarbeit, Berlin, 2015.
- [57] B.F. Minaev, Electronic mechanisms of activation of molecular oxygen, *Russ. Chem. Rev.* 76 (11) (2007) 1059–1083.

- [58] R.V. Bensasson, E.J. Land, T.G. Truscott, *Excited states and free radicals in biology and medicine: Contributions from flash photolysis and pulse radiolysis*, Oxford Univ. Press, Oxford, 1993.
- [59] A.A. Alfadda, R.M. Sallam, *Reactive oxygen species in health and disease*, *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012 (2012) 936486.
- [60] L.A. Sena, N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*, *Molecular cell* 48 (2) (2012) 158–167.
- [61] W. Droge, *Free radicals in the physiological control of cell function*, *Physiological reviews* 82 (1) (2002) 47–95.
- [62] S. Nonell, C. Flors, *Singlet Oxygen: Applications in biosciences and nanosciences: Volume 1*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.
- [63] P.H. Krupenie, *The Spectrum of Molecular Oxygen*, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1 (2) (1972) 423.
- [64] D.D. Konowalow, J.O. Hirschfelder, *Morse Potential Parameters for O[Single Bond]O, N[Single Bond]N, and N[Single Bond]O Interactions*, *Phys. Fluids* 4 (5) (1961) 637.
- [65] B.F. Minaev, G.I. Kobzev, *Response calculations of electronic and vibrational transitions in molecular oxygen induced by interaction with noble gases*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 59 (14) (2003) 3387–3410.
- [66] P.R. Ogilby, *Solvent Effects on the Radiative Transitions of Singlet Oxygen*, *Acc. Chem. Res.* 32 (6) (1999) 512–519.
- [67] C. Schweitzer, R. Schmidt, *Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen*, *Chemical reviews* 103 (5) (2003) 1685–1757.
- [68] C.S. Foote, S. Wexler, W. Ando, R. Higgins, *Chemistry of singlet oxygen. IV. Oxygenations with hypochlorite-hydrogen peroxide*, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (4) (1968) 975–981.
- [69] A. Fujishima, T.N. Rao, D.A. Tryk, *Titanium dioxide photocatalysis*, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 1 (1) (2000) 1–21.
- [70] C.S. Foote, *Mechanisms of Photosensitized Oxidation*, *Science* 162 (3857) (1968) 963–970.
- [71] F. Engelke, *Aufbau der Moleküle: Eine Einführung*, 2nd ed., Teubner, Stuttgart, 1992.
- [72] C.M. Marian, *Spin-orbit coupling and intersystem crossing in molecules*, *WIREs Comput Mol Sci* 2 (2) (2012) 187–203.
- [73] M. Kasha, *Characterization of electronic transitions in complex molecules*, *Discuss. Faraday Soc.* 9 (1950) 14.
- [74] M.A. El-Sayed, *Double Resonance and the Properties of the Lowest Excited Triplet State of Organic Molecules*, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 26 (1) (1975) 235–258.
- [75] R. Englman, J. Jortner, *The energy gap law for radiationless transitions in large molecules*, *Molecular Physics* 18 (2) (1970) 145–164.



- [76] T. Förster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Ann. Phys.* 437 (1-2) (1948) 55–75.
- [77] D.L. Dexter, A Theory of Sensitized Luminescence in Solids, *J. Chem. Phys.* 21 (5) (1953) 836.
- [78] S.H. Lin, W.Z. Xiao, W. Dietz, Generalized Förster-Dexter theory of photoinduced intramolecular energy transfer, *Phys. Rev. E* 47 (5) (1993) 3698–3706.
- [79] G.D. Scholes, Long-range resonance energy transfer in molecular systems, *Annual review of physical chemistry* 54 (2003) 57–87.
- [80] R. Baer, E. Rabani, Theory of resonance energy transfer involving nanocrystals: the role of high multipoles, *The Journal of chemical physics* 128 (18) (2008) 184710.
- [81] J. Baier, T. Fuss, C. Pöllmann, C. Wiesmann, K. Pindl, R. Engl, D. Baumer, M. Maier, M. Landthaler, W. Bäuml, Theoretical and experimental analysis of the luminescence signal of singlet oxygen for different photosensitizers, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 87 (3) (2007) 163–173.
- [82] A.A. Krasnovsky, Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research, *Biochemistry. Biokhimiia* 72 (10) (2007) 1065–1080.
- [83] S. Hackbarth, J. Schlothauer, A. Preuss, B. Röder, New insights to primary photodynamic effects--Singlet oxygen kinetics in living cells, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 98 (3) (2010) 173–179.
- [84] J.-M. Aubry, B. Mandard-Cazin, M. Rougee, R.V. Bensasson, Kinetic Studies of Singlet Oxygen [4 + 2]-Cycloadditions with Cyclic 1,3-Dienes in 28 Solvents, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (36) (1995) 9159–9164.
- [85] C.S. Foote, S. Wexler, W. Ando, Chemistry of singlet oxygen III. Product selectivity, *Tetrahedron Letters* 6 (46) (1965) 4111–4118.
- [86] A.A. Gorman, I.R. Gould, I. Hamblett, M.C. Standen, Reversible exciplex formation between singlet oxygen, 1.DELTA.g, and vitamin E. Solvent and temperature effects, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (23) (1984) 6956–6959.
- [87] E. Oliveros, F. Besançon, M. Boneva, B. Kräutler, A. Braun, Singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) sensitization and quenching by vitamin B12 derivatives, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 29 (1) (1995) 37–44.
- [88] C. Tanielian, L. Golder, Quenching Of Singlet Oxygen By Sensitizer In Dye-Sensitized Photooxygenation, *Photochem Photobiol* 34 (3) (1981) 411–414.
- [89] C.S. Foote, Y.C. Chang, R.W. Denny, Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (17) (1970) 5216–5218.

- [90] A. Farmilo, F. Wilkinson, On The Mechanism Of Quenching Of Singlet Oxygen In Solution, *Photochem Photobiol* 18 (6) (1973) 447–450.
- [91] M.A. Montenegro, M.A. Nazareno, E.N. Durantini, C.D. Borsarelli, Singlet Molecular Oxygen Quenching Ability of Carotenoids in a Reverse-micelle Membrane Mimetic System, *Photochem. Photobiol.* 75 (4) (2002) 353–361.
- [92] I.E. Kochevar, C.R. Lambert, M.C. Lynch, A.C. Tedesco, Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1280 (2) (1996) 223–230.
- [93] J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, S. Caillat, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, A. Favier, J. Cadet, Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes, *Biological chemistry* 385 (1) (2004) 17–20.
- [94] C. Thomas, R.S. MacGill, G.C. Miller, R.S. Pardini, Photoactivation Of Hypericin Generates Singlet Oxygen In Mitochondria And Inhabits Succinoxidase, *Photochem Photobiol* 55 (1) (1992) 47–53.
- [95] Y. GAUDUE, M. DUVELLEROY, Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation\*, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 16 (5) (1984) 459–470.
- [96] M. DeRosa, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews* 233-234 (2002) 351–371.
- [97] E. Koh, R. Fluhr, Singlet oxygen detection in biological systems: Uses and limitations, *Plant signaling & behavior* 11 (7) (2016) e1192742.
- [98] N. Hasebe, K. Suzuki, H. Horiuchi, H. Suzuki, T. Yoshihara, T. Okutsu, S. Tobita, Absolute phosphorescence quantum yields of singlet molecular oxygen in solution determined using an integrating sphere instrument, *Analytical chemistry* 87 (4) (2015) 2360–2366.
- [99] M. Ruzzi, E. Sartori, A. Moscatelli, I.V. Khudyakov, N.J. Turro, Time-resolved EPR study of singlet oxygen in the gas phase, *The journal of physical chemistry. A* 117 (25) (2013) 5232–5240.
- [100] A. Gollmer, J. Arnbjerg, F.H. Blaikie, B.W. Pedersen, T. Breitenbach, K. Daasbjerg, M. Glasius, P.R. Ogilby, Singlet Oxygen Sensor Green®: photochemical behavior in solution and in a mammalian cell, *Photochem. Photobiol.* 87 (3) (2011) 671–679.
- [101] J. Holmehave, S.K. Pedersen, H.H. Jensen, P.R. Ogilby, Aarhus green: A tetrafluoro-substituted derivative of fluorescein, *Arkivoc* 2015 (3) (2014) 52.
- [102] W. Adam, D.V. Kazakov, V.P. Kazakov, Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions, *Chemical reviews* 105 (9) (2005) 3371–3387.
- [103] A.P. Losev, I.M. Byteva, G.P. Gurinovich, Singlet oxygen luminescence quantum yields in organic solvents and water, *Chemical Physics Letters* 143 (2) (1988) 127–129.

- [104] R.W. Redmond, S.E. Braslavsky, Time-resolved thermal lensing and phosphorescence studies on photosensitized singlet molecular oxygen formation. Influence of the electronic configuration of the sensitizer on sensitization efficiency, *Chemical Physics Letters* 148 (6) (1988) 523–529.
- [105] C.N. Knox, E.J. Land, T.G. Truscott, Triplet state properties and triplet-state-oxygen interactions of some linear and angular furocoumarins, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1 (3) (1988) 315–321.
- [106] M.G. Debacker, O. Deleplanque, B. van Vlierberge, F.X. Sauvage, A Laser Photolysis Study of Triplet Lifetimes and of Triplet?: Triplet Annihilation Reactions of Phthalocyanins in DMSO Solutions (Etude des Durées de Vie du Triplet et des Réactions d'Annihilation Triplet?Triplet de Phthalocyanines dans le DMSO par Photolyse Laser), *Laser Chemistry* 8 (1) (1988) 1–11.
- [107] L. Ludvíková, P. Friš, D. Heger, P. Šebej, J. Wirz, P. Klán, Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: A comprehensive kinetic analysis, *Physical chemistry chemical physics* PCCP 18 (24) (2016) 16266–16273.
- [108] M.N. Berberan-Santos, E.N. Bodunov, B. Valeur, Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions 1. Kohlrausch decay function (stretched exponential), *Chemical Physics* 315 (1-2) (2005) 171–182.
- [109] S.A. Rice, C.H. Bamford, C.F.H. Tipper, R.G. Compton (Eds.), *Diffusion-limited reactions*, Elsevier, Amsterdam, New York, 1985.
- [110] M.N. Berberan-Santos, A luminescence decay function encompassing the stretched exponential and the compressed hyperbola, *Chemical Physics Letters* 460 (1-3) (2008) 146–150.
- [111] M.N. Berberan-Santos, B. Valeur, Luminescence decays with underlying distributions: General properties and analysis with mathematical functions, *Journal of Luminescence* 126 (2) (2007) 263–272.
- [112] T. Bornhütter, A.A. Ghogare, A. Preuß, A. Greer, B. Röder, *Synthesis, Photophysics and PDT Evaluation of Mono-, Di-, Tri- and Hexa-PEG Chlorins for Pointsource Photodynamic Therapy*, *Photochem Photobiol* (2017).
- [113] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, NY, 2010.
- [114] C.L. Friedrich, D. Moyles, T.J. Beveridge, R.E.W. Hancock, Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44 (8) (2000) 2086–2092.
- [115] H. Nikaido, Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux, *Science* 264 (5157) (1994) 382–388.

- [116] E. Alves, C.M.B. Carvalho, J.P.C. Tome, M.A.F. Faustino, M.G.P.M.S. Neves, A.C. Tome, J.A.S. Cavaleiro, A. Cunha, S. Mendo, A. Almeida, Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 35 (11) (2008) 1447–1454.
- [117] de Melo, Wanessa C M A, P. Avci, M.N. de Oliveira, A. Gupta, D. Vecchio, M. Sadasivam, R. Chandran, Y.-Y. Huang, R. Yin, L.R. Perussi, G.P. Tegos, J.R. Perussi, T. Dai, M.R. Hamblin, Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection, *Expert review of anti-infective therapy* 11 (7) (2013) 669–693.
- [118] G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppelotti, D. Dei, L. Fantetti, G. Chiti, G. Roncucci, Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications, *Lasers in surgery and medicine* 38 (5) (2006) 468–481.
- [119] A. Preuss, L. Zeugner, S. Hackbarth, M.A.F. Faustino, Neves, M G P M S, J.A.S. Cavaleiro, B. Röder, Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer, *Journal of applied microbiology* 114 (1) (2013) 36–43.
- [120] M. Wainwright, T. Maisch, S. Nonell, K. Plaetzer, A. Almeida, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Photoantimicrobials—are we afraid of the light?, *The Lancet Infectious Diseases* 17 (2) (2017) e49–e55.
- [121] C.H. Foyer, S. Shigeoka, Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis, *Plant physiology* 155 (1) (2011) 93–100.
- [122] A.B. Alió S, M. Mendoza, E.A. Zambrano, E. Díaz, E. Cavallera, Dermatophytes growth curve and in vitro susceptibility test: A broth micro-titration method, *Med Mycol* 43 (4) (2005) 319–325.
- [123] R.F. Donnelly, P.A. McCarron, M.M. Tunney, Antifungal photodynamic therapy, *Microbiological research* 163 (1) (2008) 1–12.
- [124] G.C. Santin, D.S.B. Oliveira, R. Galo, M.C. Borsatto, S.A.M. Corona, Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: A systematic review of the literature, *TheScientificWorldJournal* 2014 (2014) 824538.
- [125] J.C. Carmello, F. Alves, A. Ribeiro, F.G. Basso, de Souza Costa, C A, A.C. Tedesco, F.L. Primo, E.G. Mima, A.C. Pavarina, In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloroaluminum phthalocyanine, *Oral diseases* 22 (5) (2016) 415–422.
- [126] C.V.G. Pellissari, A.C. Pavarina, V.S. Bagnato, Mima, Ewerton Garcia de Oliveira, C.E. Vergani, J.H. Jorge, Cytotoxicity of antimicrobial photodynamic inactivation on epithelial cells when co-cultured with *Candida albicans*, *Photochemical & photobiological sciences Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 15 (5) (2016) 682–690.

- [127] A.S. Sousa, R.A. Prates, de Santi, Maria Eugenia Simoes Onofre, R.G. Lopes, S.K. Bussadori, L.R. Ferreira, A.M. Deana, Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 14 (2016) 111–114.
- [128] A. Preuß, I. Saltsman, A. Mahammed, M. Pfitzner, I. Goldberg, Z. Gross, B. Röder, Photodynamic inactivation of mold fungi spores by newly developed charged corroles, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 133 (2014) 39–46.
- [129] T.G.M. Smijs, S. Pavel, The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*, *Photochem Photobiol* 87 (1) (2011) 2–13.
- [130] A.A. Gorbushina, Life on the rocks, *Environmental microbiology* 9 (7) (2007) 1613–1631.
- [131] C.E. Turick, C.J. Berry, Review of concrete biodeterioration in relation to nuclear waste, *Journal of Environmental Radioactivity* 151 (2016) 12–21.
- [132] L. Graziani, E. Quagliarini, A. Osimani, L. Aquilanti, F. Clementi, C. Yéprémian, V. Lariccia, S. Amoroso, M. D'Orazio, Evaluation of inhibitory effect of TiO<sub>2</sub> nanocoatings against microalgal growth on clay brick façades under weak UV exposure conditions, *Building and Environment* 64 (2013) 38–45.
- [133] F. Gladis, R. Schumann, Influence of material properties and photocatalysis on phototrophic growth in multi-year roof weathering, *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (1) (2011) 36–44.
- [134] E.D. Quiroga, M.P. Cormick, P. Pons, M.G. Alvarez, E.N. Durantini, Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* induced by cationic porphyrin derivatives, *European journal of medicinal chemistry* 58 (2012) 332–339.
- [135] A. Preuss, T. Bornhütter, A. Farber, C. Schaller, B. Röder, Photodynamic inactivation of biofilm building microorganisms by photoactive facade paints, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 160 (2016) 79–85.
- [136] K. Kalyanasundaram, Photochemistry of water-soluble porphyrins: Comparative study of isomeric tetrapyrrolyl- and tetrakis(N-methylpyridiniumyl)porphyrins, *Inorg. Chem.* 23 (16) (1984) 2453–2459.
- [137] M. Wacker, K. Chen, A. Preuss, K. Possemeyer, B. Röder, K. Langer, Photosensitizer loaded HSA nanoparticles. I: Preparation and photophysical properties, *International journal of pharmaceutics* 393 (1-2) (2010) 253–262.
- [138] J.W. Snyder, J.D.C. Lambert, P.R. Ogilby, 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine (TMPyP) as a sensitizer for singlet oxygen imaging in cells: characterizing the irradiation-dependent behavior of TMPyP in a single cell, *Photochem. Photobiol.* 82 (1) (2006) 177–184.

- [139] K. Kano, H. Minamizono, T. Kitae, S. Negi, Self-Aggregation of Cationic Porphyrins in Water. Can  $\pi$ - $\pi$  Stacking Interaction Overcome Electrostatic Repulsive Force?, *J. Phys. Chem. A* 101 (34) (1997) 6118–6124.
- [140] K. Kano, K. Fukuda, H. Wakami, R. Nishiyabu, R.F. Pasternack, Factors Influencing Self-Aggregation Tendencies of Cationic Porphyrins in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (31) (2000) 7494–7502.
- [141] A. Iosif, U.-W. Grummt, Aggregation of Tetrakis(4-methylpyridyl)porphyrin and tetrakis(4-sulphonatophenyl)porphyrin in water, *J. Prakt. Chem.* 339 (1) (1997) 420–425.
- [142] First Sino-German Symposium on “Singlet molecular oxygen and photodynamic effects”, *Photonics & Lasers in Medicine* 4 (4) (2015).
- [143] K. Godfrey, *Compartmental Models and their application*, Academic Pr, London, 1983.
- [144] van Stokkum, Ivo H M, D.S. Larsen, R. van Grondelle, Global and target analysis of time-resolved spectra, *Biochimica et biophysica acta* 1657 (2-3) (2004) 82–104.
- [145] M.N. Berberan-Santos, E.N. Bodunov, B. Valeur, Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions: 2. Becquerel (compressed hyperbola) and related decay functions, *Chemical Physics* 317 (1) (2005) 57–62.
- [146] P. Hall, B. Selinger, Better estimates of exponential decay parameters, *J. Phys. Chem.* 85 (20) (1981) 2941–2946.
- [147] E.L. Frome, The Analysis of Rates Using Poisson Regression Models, *Biometrics* 39 (3) (1983) 665.
- [148] A. Grinvald, I.Z. Steinberg, On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares, *Analytical biochemistry* 59 (2) (1974) 583–598.
- [149] K.-H. Grellmann, *Excited State Lifetime Measurements*. Von J. N. Demas. Academic Press, New York 1983. VIII, 273 S., geb. \$ 45.00. – ISBN 0-12-208920-0, *Angew. Chem.* 97 (2) (1985) 138–139.
- [150] P. Meier, Variance of a Weighted Mean, *Biometrics* 9 (1) (1953) 59.
- [151] A.P. Hitchens, M.C. Leikind, The Introduction of Agar-agar into Bacteriology, *Journal of Bacteriology* 37 (5) (1939) 485–493.
- [152] M9, *Cold Spring Harb Protoc* 2006 (1) (2010) pdb.rec8146.
- [153] M. Chandler, R.E. Bird, L. Caro, The replication time of the Escherichia coli K12 chromosome as a function of cell doubling time, *Journal of Molecular Biology* 94 (1) (1975) 127–132.
- [154] C. Sorokin, R.W. Krauss, Maximum Growth Rates of Chlorella in Steady-State and in Synchronized Cultures, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45 (12) (1959) 1740–1744.

- [155] M. Cuenca-Estrella, A. Gomez-Lopez, E. Mellado, M.J. Buitrago, A. Monzon, J.L. Rodriguez-Tudela, *Scopulariopsis brevicaulis*, a Fungal Pathogen Resistant to Broad-Spectrum Antifungal Agents, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47 (7) (2003) 2339–2341.
- [156] T.G.M. Smijs, H.J. Schuitmaker, Photodynamic Inactivation of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*, *Photochem Photobiol* 77 (5) (2003) 556.
- [157] L.d.M. Baltazar, B.M. Soares, H.C.S. Carneiro, T.V. Avila, L.F. Gouveia, D.G. Souza, M.V.L. Ferreira, M. Pinotti, D.d.A. Santos, P.S. Cisalpino, Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: In vitro activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (2) (2013) 354–361.
- [158] O. Welsh, L. Vera-Cabrera, E. Welsh, Onychomycosis, *Clinics in dermatology* 28 (2) (2010) 151–159.
- [159] A. Krieger-Liszkay, Singlet oxygen production in photosynthesis, *Journal of experimental botany* 56 (411) (2005) 337–346.
- [160] G.H. Krause, E. Weis, Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42 (1) (1991) 313–349.
- [161] R. Pedros, I. Moya, Y. Goulas, S. Jacquemoud, Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf, *Photochemical & photobiological sciences Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 7 (4) (2008) 498–502.
- [162] F. Franck, P. Juneau, R. Popovic, Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1556 (2-3) (2002) 239–246.
- [163] J. Tellinghuisen, C.W. Wilkerson, Bias and precision in the estimation of exponential decay parameters from sparse data, *Anal. Chem.* 65 (9) (1993) 1240–1246.
- [164] J. Enderlein, R. Erdmann, Fast fitting of multi-exponential decay curves, *Optics Communications* 134 (1-6) (1997) 371–378.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mögliche Anwendungsgebiete der PDI. Im Gegensatz zu Antibiotika, die nur gegen Bakterien wirken, kann die PDI auch gegen phototrophe Organismen wie Algen oder Cyanobakterien und Pilze eingesetzt werden. Übersetzt aus [30].	8
Abbildung 2: Potentialkurven des Grundzustands und der ersten angeregten Zustände des Sauerstoffmoleküls. Erstellt mit Daten aus [63,64].	15
Abbildung 3: Besetzungsdiagramm der $\pi_{p_z}^*$ und $\pi_{p_y}^*$ Orbitale des molekularen Sauerstoffs.	15
Abbildung 4: Jablonski Diagramm zur Darstellung der elektronischen und vibronischen Zustände von Photosensibilisator und Sauerstoff und aller relevanten Prozesse.	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Dexter Energietransfers zwischen Photosensibilisator und molekularem Sauerstoff.	20
Abbildung 6: Spektrum der $^1\text{O}_2$ Lumineszenz in Ethanol, generiert durch Phäophorbid a ( $\text{OD}_{666\text{ nm}} = 0,2$ ; $\lambda_{\text{exc}} = 532\text{ nm}$ ).	25
Abbildung 7: Jablonski Diagramm mit allen relevanten Raten für die Herleitung der Kinetik von $^1\text{O}_2$ in einem homogenen System.	25
Abbildung 8: Darstellung einer gemessenen $^1\text{O}_2$ Lumineszenzkinetik in Wasser, inklusive Fit des Kinetikmodells und ermittelten An- und Abklingzeit.	26
Abbildung 9: Verteilung $H(k)$ der Ratenkonstanten $k$ für Kohlrauschfunktionen mit $\tau_0 = 1$ und verschiedenen Werten für $\beta$ . Nach [108].	31
Abbildung 10: Mögliche Anwendungsgebiete der PDI. Im Gegensatz zu Antibiotika, die nur gegen Bakterien wirken, kann die PDI auch gegen phototrophe Organismen wie Algen oder Cyanobakterien und Pilze eingesetzt werden. Übersetzt aus [30].	34
Abbildung 11: Schematischer Aufbau der Zellwand von $\text{gram}^+$ und $\text{gram}^-$ Bakterien. 1: perioplastischer Raum, 2: Plasmamembran, 3: Murein, 4: äußere Membran mit aufgelagerten Lipopolysacchariden, 5: Cytoplasma. Adaptiert aus [55].	35
Abbildung 12: Strukturformeln von TMPyP und $\text{PCor}^+$ . Beide Moleküle sind kationisch und eignen sich sehr gut als Photosensibilisatoren für die PDI.	40
Abbildung 13: Extinktions- und Fluoreszenzspektrum von $\text{PCor}^+$ in $\text{H}_2\text{O}$ . Neben der Soretbande bei 413 nm sind vier Banden zwischen 470 und 600 nm zu	



erkennen. Das Fluoreszenzspektrum zeigt eine dominante Bande bei 600 nm und eine schwache Bande bei 645 nm. ....	43
Abbildung 14: Extinktions- und Fluoreszenzspektrum von TMPyP in H <sub>2</sub> O. Neben der Soretbande bei 423 nm sind vier Banden zwischen 500 und 650 nm zu erkennen. Das Fluoreszenzspektrum zeigt eine dominante Bande bei 660 nm und eine schwache Bande bei 720 nm. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenzbanden ist stark vom Lösungsmittel beziehungsweise der Mikroumgebung abhängig [136]. ....	43
Abbildung 15: <sup>1</sup> O <sub>2</sub> Lumineszenzkinetik von TMPyP und PCor <sup>+</sup> in H <sub>2</sub> O (jeweils 3 µM). Anregung mit 0,3 µJ bei 405 nm. ....	44
Abbildung 16: Qualitative Transmissionsspektren der verwendeten Filter zur Wellenlängenselektion bei zeitaufgelöster <sup>1</sup> O <sub>2</sub> Lumineszenz Detektion. ....	48
Abbildung 17: optische Separation von VIS und NIR Licht. ....	49
Abbildung 18: Skizze der Anregungs- und Detektions-Optik. Das Anregungslicht wird in einem Winkel von 40° durch eine Linse auf die Probenoberfläche fokussiert. Senkrecht zur Probenoberfläche wird die durch den Laser angeregte Fläche durch ein Linsensystem mit einer 6-fachen Vergrößerung auf eine Faser abgebildet. ....	50
Abbildung 19: Anregungs- und Detektionsgeometrie. Das rot umrandete Bild verdeutlicht die Position der Fokussierungslinse des Anregungs-Laserstrahls und die beiden Detektionslinsen. ....	51
Abbildung 20: Geometrie des ideal fokussierten Anregungslaserstrahles. ....	51
Abbildung 21: Fotos zur Veranschaulichung der Streuung des Anregungslichts auf verschiedenen Proben. Der Weg des Anregungslasers ist im rechten Foto skizziert. Die Rotfärbung auf dem Filterpapier auf der Agarplatte (zweites Foto von links) und der Pheo-PCL Probe (rechts) sind durch die Fluoreszenz des applizierten Photosensibilisators bedingt. ....	52
Abbildung 22: Illustration des Probentisches, der Anregungs- und Detektionsoptik und einer im Probenhalter fixierten Petrischale. ....	53
Abbildung 23: Benutzeroberfläche des Programms zur Bedienung des Messplatzes. Links oben ist die Steuerung des Probentisches (x,y Bewegung) und der Detektionsoptik (z Bewegung). Links unten ist die Bedienung der angeschlossenen Geräte. Mittig unten ist die Bedienung einer Raster Messung. Rechts unten sind weitere Einstellungen möglich. ....	54

Abbildung 24: Schematische Darstellung der Softwarearchitektur des Programms zur Bedienung des Messplatzes.....	55
Abbildung 25: Prozessablaufdiagramm während einer Rastermessung. ....	56
Abbildung 26: $^1\text{O}_2$ Amplituden der TMPyP-PCL Probe bei Variation des vertikalen Abstands zur Probe um die optimale Position. ....	60
Abbildung 27: Verlauf der $^1\text{O}_2$ Amplituden (links) und den An- und Abklingzeiten (rechts) von 100 direkt hintereinander durchgeführten $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Messungen an Pheo in Ethanol. Das Inset der rechten Abbildung zeigt den Verlauf der Anklingzeit $\tau_2$ detaillierter. Sowohl die $^1\text{O}_2$ Amplitude als auch die An- und Abklingzeit bleibt über 100 Messungen nahezu konstant.....	61
Abbildung 28: Verlauf der $^1\text{O}_2$ Amplituden (links) und den An- und Abklingzeiten (rechts) von 100 direkt hintereinander durchgeführter $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Messungen an TMPyP-PCL. Die $^1\text{O}_2$ Amplitude zeigt eine fallende Tendenz. Die Abklingzeit $\tau_1$ zeigt eine steigende Tendenz, während die Anklingzeit $\tau_2$ nahezu konstant bleibt. ....	62
Abbildung 29: Verlauf der $^1\text{O}_2$ Amplituden (links) und den An- und Abklingzeiten (rechts) von $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Messungen an TMPyP-PCL über einen Zeitraum von 200 Tagen.....	63
Abbildung 30: Foto der TMPyP-PCL Probe mit markiertem Scan Bereich. ....	64
Abbildung 31: Intensitätsplot der $^1\text{O}_2$ Amplitude und gemessene $^1\text{O}_2$ Lumineszenz eines Pixels mit Fit des entsprechenden Kinetikmodells der TMPyP-PCL Probe. Die Ursache der leichten vertikalen Tendenz der Amplituden ist eine leichte Krümmung der Oberfläche der TMPyP-PCL Probe.....	64
Abbildung 32: Verteilung der $^1\text{O}_2$ Amplituden des TMPyP-PCL Scans mit daraus ermittelter Verteilungsfunktion (gaussförmig). Das eingebettete Diagramm zeigt die Verteilung der Konfidenzintervalle der $^1\text{O}_2$ Amplitude mit entsprechender Verteilungsfunktion. ....	65
Abbildung 33: Vergleich der normierten Verteilungen der Konfidenzintervalle und der mittleren quadratischen Differenz der „Nachbar“ Pixel für die $^1\text{O}_2$ Amplitude $A_0$ (links), $\tau_1$ (mitte) und $\tau_2$ (rechts).....	66
Abbildung 34: Verteilungen der $^1\text{O}_2$ Amplitude zweier bis auf die Detektionsfaser identischer Scans der TMPyP-PCL Probe. Mit der 2000 $\mu\text{m}$ Detektionsfaser (F2000) wird eine etwa 11fach höhere $^1\text{O}_2$ Amplitude erwartet im Vergleich zur 600 $\mu\text{m}$ Detektionsfaser(F600). ....	67

Abbildung 35: Analyse der NIR Lumineszenzkinetik der vier in Abschnitt 0 vorgestellten PCL Proben. Für Pheo und TMPyP genügt ein Modell mit 2 Kompartimenten um die gemessene Lumineszenz zufriedenstellend zu beschreiben. Bei ZnPcF16 und Eo tauchen Störsignale auf, sodass ein Modell mit 3 Kompartimenten notwendig ist. ....	71
Abbildung 36: Zerlegung der NIR Lumineszenzkinetik in $^1\text{O}_2$ Lumineszenzkinetik und Störkinetik, gemessen auf der Oberfläche von TMPyP-PCL, ZnPcF16-PCL und Eo-PCL. ....	72
Abbildung 37: Vergleich der Fitqualität für einen Pixel (oben links), die Summe über 10 Pixel (oben rechts), die Summe über 100 Pixel (unten links) und die Summe über alle (279) Pixel (unten rechts). Das Signal-Rausch-Verhältnis wird mit steigender Pixelzahl größer, die Qualität des Fits wird jedoch schlechter, wie die Residuen zeigen. ....	75
Abbildung 38: Vergleich der $^1\text{O}_2$ Lumineszenz, generiert durch 5 $\mu\text{l}$ TMPyP (1 mM) gemessen auf der Oberfläche von BBM Agar, eine Stunde nach Probenpräparation. Die Messdauer betrug 10 s. ....	78
Abbildung 39: Vergleich der NIR Lumineszenz gemessen auf trockenem Filterpapier und Filterpapier auf verschiedenen Agarplatten. Im Vergleich zur NIR Lumineszenzkinetik auf trockenem Filterpapier zeigt die NIR Lumineszenzkinetik auf Agarplatten eine deutlich geringere Intensität, sowie deutlich komplexere Kinetik. Gezeigt ist die Summe des Signals von 5 Pixeln. ....	81
Abbildung 40: NIR Lumineszenzkinetik von TMPyP auf verschiedenen Agarplatten. Die Agarplatten enthalten die unterschiedlichen Bestandteile und Kombinationen von Bestandteilen des LB-Mediums. Gezeigt ist der Fit der Summe des Signals von 5 Pixeln. Zu sehen ist ein deutliches Quenching der $^1\text{O}_2$ Lumineszenz durch Trepton (TR) und Hefeextrakt (HE). ....	82
Abbildung 41: Verlauf der $^1\text{O}_2$ Amplitude und der Zeiten $\tau_1$ und $\tau_2$ innerhalb der ersten 120 min nach dem Auftropfen von 5 $\mu\text{l}$ einer 1 mM TMPyP- $\text{H}_2\text{O}$ Lösung auf ein Filterpapier, das auf einer BBM Agarplatte liegt. Die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz wurde wiederholt für je 10 s gemessen. ....	85
Abbildung 42: Skizze und Foto der Anordnung der Filterpapiere auf der Agarplatte. Auf die Filterpapiere wurden jeweils 5 $\mu\text{l}$ einer TMPyP-Lösung (obere Reihe) bzw. einer PCor <sup>+</sup> -Lösung (untere Reihe) gegeben. Von links nach rechts wurden	

die Konzentrationen von halbiert von 5 µl einer 1 mM Lösung bis zu 5 µl einer 7,8 µM Lösung. Das Foto zeigt beispielhaft die BBM-Agarplatte. ....	87
Abbildung 43: Illustration der Messungen und der Datenauswertung. Auf der Oberfläche der Probe sequenziell die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz und die Fluoreszenz gescannt. Für jeden Pixel wird sowohl Fluoreszenzintensität als auch die $^1\text{O}_2$ Lumineszenzkinetik bestimmt. Gezeigt sind hier das Foto, sowie die Daten der M9 Agarplatte. ....	89
Abbildung 44: $^1\text{O}_2$ Lumineszenzkinetik der verschiedenen TMPyP Stoffmengen auf einer M9-Agarplatte. Dargestellt ist jeweils der Pixel mit der größten $^1\text{O}_2$ Lumineszenz Amplitude. Auch für die geringste TMPyP Menge ist noch eine $^1\text{O}_2$ Lumineszenzkinetik zu erkennen. ....	90
Abbildung 45: $^1\text{O}_2$ Amplituden von TMPyP und PCor <sup>+</sup> mit abnehmender Stoffmenge auf einer BBM- und M9-Agarplatte. Auch für die geringste Stoffmenge ist noch eine signifikante $^1\text{O}_2$ Amplitude zu detektieren. ....	91
Abbildung 46: Foto und Skizze der Anordnung der Proben auf der Petrischale. Auf dem Foto sind drei am Rand der Petrischale positionierten Filterpapiere erkennbar. Diese wurden mit den drei Bakteriensuspensionen behandelt, um ein Bakterienwachstum zu überwachen. ....	95
Abbildung 47: Vergleich von Foto (oben) und Intensitätsplots der Fluoreszenzintensität (mitte) und $^1\text{O}_2$ Amplitude (unten) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation) und Tag 2. An Tag 0 ist eine deutliche Abhängigkeit zwischen der $^1\text{O}_2$ Lumineszenz zur Bakterienkonzentration zu beobachten. An Tag zwei ist an den Bakterienproben C1-C3 noch eine Photosensibilisator Fluoreszenz zu sehen, aber kaum $^1\text{O}_2$ Lumineszenz zu sehen. ....	96
Abbildung 48: NIR Lumineszenz der drei E. coli –TMPyP Proben C1 und C3 (links) an Tag 0 und Tag 2 und der TMPyP Referenz (rechts) im Verlauf einer Woche. Gezeigt ist die Summe von je 25 Pixeln. ....	97
Abbildung 49: Vergleich der NIR Lumineszenz von C3 An Tag 1 und Tag 5, gemessen bei 1270 nm (grün) und 1230 nm (grau). ....	98
Abbildung 50: NIR Lumineszenzkinetik der E. coli Referenz der TMPyP Messreihe an Tag 5. Sie lässt sich durch eine Kohlrauschfunktion mit $\tau=0,1$ und $\beta=0,3$ annähern. ....	98
Abbildung 51: Kinetikparameter und ihre Konfidenzintervalle der TMPyP- E. coli Probe an Tag 0, also eine Stunde nach der Probenpräparation. In der Amplitude ist eine deutliche Korrelation zur Bakterienkonzentration zu beobachten. Die Abklingzeit ist für C2, C3 und die Photosensibilisator Referenz gleich, nur C1	

	zeigt eine deutlich kürzere Abklingzeit. Die Anklingzeit ist innerhalb der Konfidenzintervalle gleich.....	99
Abbildung 52:	Verlauf der TMPyP Fluoreszenz (links), der $^1\text{O}_2$ Amplitude (mitte) und der Amplitude des Störsignals (rechts) über den gesamten Zeitraum des Experiments. Bereits an Tag 1 ist die $^1\text{O}_2$ Lumineszenz stark gequencht, während die Fluoreszenzintensität unverändert ist. ....	100
Abbildung 53:	Verlauf der Anklingzeit (links) und der Abklingzeit (mitte) der TMPyP Referenz und der Probe C3. Rechts ist der Verlauf der Abklingzeit, der im zweiten Experiment mit geringeren Bakterienkonzentrationen ermittelt wurde. Die initiale Bakterienkonzentration von C3 im ersten und C2 im zweiten Experiment waren ungefähr gleich. C3 im zweiten Experiment entspricht einer deutlich geringeren initialen Bakterienkonzentration. ....	100
Abbildung 54:	Vergleich von Foto (oben) und Intensitätsplots der Fluoreszenzintensität (mitte) und $^1\text{O}_2$ Amplitude (unten) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation) und Tag 2. Im Vergleich zu TMPyP zeigt die Lumineszenz von PCor <sup>+</sup> keine deutliche räumliche Abhängigkeit zu den Filterpapieren. An Tag 2 ist die Photosensibilisator Fluoreszenz nahezu über den gesamten Scanbereich gleichverteilt. Die Verteilung der $^1\text{O}_2$ Lumineszenz zeigt eine Abhängigkeit zum Bakterienwachstum: Am Ort des Bakterienwachstums ist keine $^1\text{O}_2$ Lumineszenz erkennbar. ....	101
Abbildung 55:	Verlauf der Abklingzeit (links) und der Anklingzeit (mitte) der PCor <sup>+</sup> Referenz und der Probe C3. Rechts ist der Verlauf der Anklingzeit, der im zweiten Experiment mit geringeren Bakterienkonzentrationen ermittelt wurde....	102
Abbildung 56:	Skizze der Anordnung der Proben auf der Petrischale. Auf dem Foto ist als Beispiel die Petrischale der TMPyP-T. rubrum Probe gezeigt.....	105
Abbildung 57:	Bilder der TMPyP- S. brevicaulis Probe. Vergleich von Foto (links), Fluoreszenzintensität (mitte) und $^1\text{O}_2$ Amplitude (rechts) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation), Tag 3, Tag 13 und Tag 24.....	106
Abbildung 58:	Bilder der PCor <sup>+</sup> -S. brevicaulis Probe. Vergleich von Foto (links), Fluoreszenzintensität (mitte) und $^1\text{O}_2$ Amplitude (rechts) an Tag 0 (Tag der Probenpräparation), Tag 3, Tag 12 und Tag 19.....	107
Abbildung 59:	NIR Lumineszenzkinetik des Pixels mit der höchsten $^1\text{O}_2$ Amplitude der C1-TMPyP-S. brevicaulis Probe (links), also der Probe mit der geringsten initialen Sporenkonzentration und der C4-PCor <sup>+</sup> -S. brevicaulis Probe, also der Probe mit der höchsten initialen Sporenkonzentration.....	108

Abbildung 60: NIR Lumineszenzkinetik (links) und daraus extrahierte $^1\text{O}_2$ Lumineszenzkinetik der C3 T. rubrum – TMPyP Probe. Gezeigt ist wieder der Pixel mit der höchsten Amplitude.....	109
Abbildung 61: Verlauf der Abklingzeit aller TMPyP- S. brevicaulis Proben.....	110
Abbildung 62: Verlauf der Abklingzeit $\tau_1$ (links) und der Anklingzeit $\tau_2$ (rechts) der TMPyP-T. rubrum (oben) und PCor <sup>+</sup> -T. rubrum (unten). Die Werte und ihre Fehlerbalken repräsentieren den fehlergewichteten Mittelwert und dessen Standardabweichung über den gesamten Scanbereich einer jeden Probe.....	110
Abbildung 63: Skizze und Foto der Anordnung der Probe auf der Petrischale. Der rotumrandete Bereich auf dem Foto entspricht dem Scanbereich.....	112
Abbildung 64: Fotos, Intensitätsplots der gemessenen Fluoreszenzintensität und der $^1\text{O}_2$ Amplitude der Algenreferenz, der PCor <sup>+</sup> -Algen Probe und der TMPyP Probe an Tag 1, also einen Tag nach der Probenpräparation. ....	113
Abbildung 65: Vergleich der Emissionsspektren der Photosensibilisatoren, der Algenreferenz und den Photosensibilisator-Algen Proben.....	114
Abbildung 66: Verteilung der Fluoreszenzintensität der PCor <sup>+</sup> -Algen Probe des gesamten gemessenen Spektrums (links) und des spektralen Bereichs der PCor <sup>+</sup> Fluoreszenz (mitte). Ein Vergleich letzterer Verteilung mit der $^1\text{O}_2$ Amplitude (rechts) zeigt eine deutliche laterale Abhängigkeit.....	115
Abbildung 67: Verlauf der NIR Lumineszenzkinetik über den Zeitraum des Experiments. Gezeigt ist jeweils die Summe über die fünf Pixel mit der stärksten $^1\text{O}_2$ Amplitude. In der oberen Reihe ist der Verlauf der PCor <sup>+</sup> Referenz (links) und der Algen-PCor <sup>+</sup> Probe(rechts) dargestellt, analog dazu sind in der unteren Reihe die Verläufe der Lumineszenzkinetik für TMPyP dargestellt. ....	116
Abbildung 68: Verläufe der $^1\text{O}_2$ Amplitude $A_0$ (links) und der Amplitude des Störsignals $A_{\text{Stör}}$ (rechts) für die PCor <sup>+</sup> (oben) und TMPyP Proben (unten). Für beide Photosensibilisatoren ist eine Abnahme der $^1\text{O}_2$ Amplitude und eine Zunahme der Amplitude des Störsignals über die Zeit zu erkennen.....	117
Abbildung 69: Verläufe der Abklingzeit $\tau_1$ (links) und der Anklingzeit $\tau_2$ (rechts) für die PCor <sup>+</sup> (oben) und TMPyP Proben (unten).....	118
Abbildung 70: Eine Optimierung der Software um auch komplexere Pfade ab zu scannen würde die Messdauer eines Scans verringern.....	124

# Publikationen

## Zeitschriftenartikel

- T. Bornhütter, N. Shamali, I. Saltsman, A. Mahammed, Z. Gross, G. Daeschlein, B. Röder  
*Singlet oxygen luminescence kinetics under PDI of pathogenic dermatophytes and molds*  
**Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 2018, 178, 606-613  
DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.12.015
- T. Bornhütter, A. A. Ghogare, A. Preuß, A. Greer, B. Röder,  
*Synthesis, Photophysics and PDT Evaluation of Mono-, Di-, Tri- and Hexa-PEG Chlorins for  
Pointsource Photodynamic Therapy*  
**Photochem Photobiol.** 2016, Accepted Author Manuscript.  
DOI: 10.1111/php.12773
- T. Bornhütter, J. Pohl, C. Fischer, I. Saltsman, A. Mahammed, Z. Gross, B. Röder  
*Development of Singlet Oxygen Luminescence Kinetics during the Photodynamic Inactivation  
of Green Algae*  
**Molecules** 2016, 21, 485  
DOI: 10.3390/molecules21040485
- A. Preuß, I. Thomas, T. Bornhütter, A. Müller, A. Prager, A. Schulze, B. Röder  
*Electron beam functionalized photodynamic antimicrobial polyethersulfone membranes*  
eingereicht zur Publikation
- M. Luciano, M. Erfanzadeh, F. Zhou, H. Zhu, T. Bornhütter, B. Röder, Q. Zhu, C. Brückner  
*In vivo photoacoustic tumor tomography using a quinoline-annulated porphyrin as NIR  
molecular contrast agent*  
**Org. Biomol. Chem.**, 2017, 15, 972-983  
DOI: 10.1039/c6ob02640k
- A. Preuß, T. Bornhütter, A. Färber, C. Schaller, B. Röder  
*Photodynamic inactivation of biofilm building microorganisms by photoactive facade paints*  
**Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 2016, 160, 79–85  
DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.04.008

## Buchkapitel

- S. Hackbarth, T. Bornhütter, B. Röder  
*Chapter 26: Singlet Oxygen in Heterogeneous Systems*  
**Singlet Oxygen : Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 2**, 2016, 27-

**Konferenzbeiträge (als Vortragender)**

- T. Bornhütter

*Time Resolved Singlet Oxygen Luminescence Measurements on Surfaces with Algae, Bacteria and Fungi*

**2nd Sino-German Symposium on Singlet molecular Oxygen and Photodynamic Effects**, Berlin 2017

**Konferenzbeiträge**

- B. Röder, T. Bornhütter, J. Pohl

*2D Singlet Oxygen Luminescence Observation of Photodynamic Inactivation of Microorganisms on Surfaces*

**International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, ICPP-9**, Nanjing, China 2016

**Patente**

- J. Schlothauer, L. Jäger, T. Bornhütter, B. Röder,

*Probenhalter für eine Prüfvorrichtung und Verfahren zur Prüfung von Umwelteinflüssen auf eine Probe*

(Veröffentlichungsnummer: DE201210221673) 2012.



## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Beate Röder bedanken. Sie ermöglichte mir die Bearbeitung einer Bachelorarbeit, einer Masterarbeit und einer Promotion in ihrer Arbeitsgruppe. Dabei hatte sie immer ein offenes Ohr für meine Anliegen und unterstützte mich in der gesamten Zeit mit ihrer Erfahrung und ihrem außerordentlichen Fachwissen, mit neuen Ideen und der Möglichkeit eigene Ideen umzusetzen sowie mit konstruktiven und motivierenden Ratschlägen.

Dr. Annegret Preuß, Alexander Müller, Jakob Pohl und Nedaa Shamali möchte ich für die effiziente und harmonische Zusammenarbeit im Mikrobiologielabor danken. Auch Christian Fischer möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit und die Hilfe während der Bearbeitung seiner Masterarbeit danken. Für die gemeinsame Zeit im Singulett-Sauerstoff Labor möchte ich Dr. Jan Schlothauer, Dr. Steffen Hackbarth, Michael Pfitzner und Alexander Müller danken. Lutz Jäger und Marek Koch waren für mich eine wertvolle Hilfe und Unterstützung im Chemielabor.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Jan Schlothauer. Während unserer gemeinsamen Bürozeit konnten wir in einem angenehmen Büroklima (menschlich und meteorologisch) stets freundschaftlich zusammen- und nebeneinander arbeiten. Dr. Steffen Hackbarth und Dr. Ronald Steffen gebührt Dank, da sie meine diversen, sehr spontanen Anfragen immer hilfsbereit beantwortet haben.

Ein besonderer Dank gilt auch Hans Scholz und Thorsten Rausche sowie den Mitarbeitern der Elektronischen und Mechanischen Werkstatt für die Zusammenarbeit, insbesondere für viele Elektronik-Lehrstunden bei Hans Scholz.

Dr. Ronald Steffen, Alexander Müller, David Grote, Sven Seibert und Dr. Annegret Preuß haben meine Arbeit Korrektur gelesen – habt vielen Dank dafür.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Photobiophysik für ein äußerst angenehmes Arbeitsklima bedanken. Der harmonische und offene Umgang miteinander haben meine Arbeit über die Jahre hinweg geprägt.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Partnerin Tabea, meiner Familie und meinen Freunden für die ständige und uneingeschränkte Unterstützung bedanken.

## Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß §7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad im Promotionsfach Physik beworben und besitze keinen Doktorgrad im Promotionsfach Physik.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 habe ich zur Kenntnis genommen.

Berlin, den